

CÁPSIDES VARIANTES DE VIRUS ADENOASOCIADOS Y SU USO PARA INHIBIR LA ANGIOGÉNESIS

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[001] Esta solicitud invoca el beneficio de las Solicitudes de Patente Provisional de los Estados Unidos Nos. 62/590.976, presentada el 27 de noviembre de 2017 y 62/664.726, presentada el 30 de abril de 2018, cuyas divulgaciones se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia.

INCORPORACIÓN A MODO DE REFERENCIA DE UN LISTADO DE SECUENCIAS PROVISTO COMO ARCHIVO DE TEXTO

[002] Se provee un Listado de Secuencias adjunto como un archivo de texto, “090400-5010-WO-seq-listing.txt” creado el 26 de noviembre de 2018 y que tiene un tamaño de 238 KB. Los contenidos del archivo de texto se incorporan a la presente a modo de referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA INVENCION

[003] La invención descrita en la presente se relaciona en general con el campo de los viriones de virus adenoasociados (AAV) que comprenden proteínas variantes de la cápside y la generación de dichas cápsides variantes mediante el uso de técnicas de evolución dirigida.

ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

[004] Las enfermedades retinianas hereditarias abarcan un grupo numeroso de enfermedades genéticas heterogéneas que afectan aproximadamente 1 de 3000 personas (más de 2 millones de personas en el mundo) y son una causa principal de pérdida severa de la visión o ceguera. Las enfermedades retinianas complejas, multifactoriales, tales como la degeneración macular relacionada con la edad húmeda (wAMD) y la retinopatía diabética (DR) impactan incluso en más individuos, con 1,7 millones de estadounidenses viviendo en la actualidad con pérdida severa de la visión central asociada con wAMD y casi un tercio de los adultos mayores de 40 años con diabetes que presentan deterioro en la visión. Estas enfermedades habitualmente se asocian con la disfunción o muerte de uno o más tipos de células de la retina, en algunos casos debido a la ausencia de la expresión o función de una proteína clave, por ejemplo RPE65 en LCA2, en otros casos debido a mutaciones genéticas que crean productos

génicos tóxicos, por ejemplo mutaciones dominantes que afectan al plegado de la proteína rodopsina, o en otros casos debido a cambios en la fisiología de la retina inducidos por la expresión ectópica de una proteína, por ejemplo VEGF en wAMD.

[005] Una estrategia para abordar esta gran necesidad médica insatisfecha es la terapia génica mediada por virus adenoasociados (AAV), en la cual se usa un virus adenoasociado recombinante (rAAV) para administrar un gen a uno o más tipos de células de la retina, por ejemplo para reemplazar un gen faltante, para corregir un gen defectivo dominante o para promover un molde para una terapia proteica continua. Mientras que la terapia génica clínica basada en AAV ha sido cada vez más exitosa, la misma está todavía repleta de deficiencias con respecto a las propiedades de los vectores virales, incluyendo, por ejemplo, el direccionamiento a las células deseadas de la retina con alta eficacia. Por ejemplo, se han identificado y caracterizado múltiples serotipos homólogos de AAV de primates y numerosos serotipos de primates no humanos, en donde el AAV2 es el mejor caracterizado entre los serotipos de AAV y el primero en ser adaptado como vehículo de administración génica en el ojo. Sin embargo, no se ha informado que estos AAV (incluyendo al AAV2) sean eficaces para transducir los tipos celulares más profundos de la retina cuando se administran a través de administración intravítrea. En consecuencia, hay una necesidad en la materia de nuevas variantes de AAV con capacidades superiores de transducción que provean una administración más eficaz, basada en genes, a las células de la retina para el tratamiento de la enfermedad ocular. Existe una necesidad en la materia de dichas variantes de AAV que muestren un mayor perfil de transducción en retina – en algunos casos en forma amplia, en otros casos preferiblemente a ciertos tipos de células de la retina -- en comparación con los AAV de tipo salvaje y las variantes de AAV conocidas en la materia.

[006] El AAV de origen natural es un virus a ADN de simple hebra que contiene tres marcos abiertos de lectura, *rep*, *cap* y *aap*. El primer gen, *rep*, codifica para cuatro proteínas necesarias para la replicación del genoma (Rep78, Rep68, Rep52, y Rep40), el segundo, *cap*, expresa tres proteínas estructurales (VP1-3) que constituyen la forma de la cápside viral, y el tercero expresa la proteína activante de ensamblaje (AAP) que es esencial para el ensamblaje de la cápside. El AAV depende de la presencia de un virus colaborador, tal como un adenovirus o herpesvirus, para su activa replicación. En ausencia de un virus colaborador, el AAV establece un estado latente

en el cual su genoma se mantiene en forma episomal o integrado en el cromosoma huésped en el locus AAVS1.

[007] Se pueden usar técnicas de evolución dirigida *in vitro* e *in vivo* para seleccionar variantes de AAV que ofrezcan una mejora por sobre los vectores actuales de administración de genes basados en AAV. Dichas técnicas de evolución dirigida son conocidas en la materia y se describen, por ejemplo, en la Publicación PCT WO 2014/194132 y en Kotterman & Schaffer (Nature Review Genetics, AOP, publicado en línea el 20 de mayo de 2014; doi: 10.1038/nrg3742), ambas de las cuales se incorporan a la presente en su totalidad a modo de referencia. La evolución dirigida es una estrategia de manipulación de cápsides que emula la evolución natural a través de rondas iterativas de procesos de diversificación genética y selección, permitiendo así la acumulación de mutaciones beneficiosas que mejoran progresivamente la función de una biomolécula tal como un virión basado en AAV. En esta estrategia, se diversifican los genes *cap* de AAV de tipo salvaje para crear grandes bibliotecas génicas que se empaquetan para generar bibliotecas de partículas virales, y se aplica una presión de selección para aislar las variantes únicas con fenotipos superiores que puedan superar las barreras de administración de genes.

[008] Las variantes de AAV se han descrito, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos 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; Publicaciones de los Estados Unidos Número 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; Publicaciones Europeas Números 2692731 A1; 2383346 B1; 2359865 B1; 2359866 B1; 2359867 B1; y 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 Publicaciones Internacionales (PCT) Número 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 las variantes de AAV descritas en la presente.

[009] Todos los documentos y referencias citados en la presente y en los documentos de patentes referidas, se incorporan a la presente a modo de referencia.

SÍNTESIS DE LA INVENCION

[0010] En la presente se proveen proteínas variantes de la cápside de virus adenoasociado (AAV) que tienen una o más modificaciones en la secuencia de aminoácidos en relación a una proteína de la cápside de AAV parental, las cuales, cuando están presentes en un virión de AAV, confieren infectividad aumentada de uno o más tipos de células de la retina en comparación con la infectividad de las células de la retina por un virión de AAV que comprende una proteína de la cápside de AAV parental sin modificar. También se proveen viriones de AAV recombinantes y composiciones farmacéuticas de los mismos que comprenden una proteína variante de la cápside de AAV como se describe en la presente, métodos para elaborar proteínas de la cápside y viriones variantes de rAAV, y métodos para usar estas proteínas de la cápside y viriones de rAAV en 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 proveen proteínas variantes de la cápside de virus adenoasociado (AAV), en donde estas proteínas variantes de la cápside de AAV tienen una o más modificaciones en la secuencia de aminoácidos en relación a una cápside de AAV parental, que, cuando están presentes en un virión de AAV, confieren infectividad aumentada de uno o más tipos de células de la retina (por ejemplo una célula fotorreceptora (por ejemplo bastones; conos), una célula ganglionar de la retina (RGC), una célula glial (por ejemplo una célula gliales de Müller, una célula microglial), una célula bipolar, una célula amácrina, una célula horizontal, y/o una célula del epitelio pigmentario de la retina) en comparación con la infectividad de las células de la retina por un virión de AAV que comprende una proteína de la cápside de AAV parental que no comprende la modificación de la secuencia de aminoácidos.

[0012] En algunos aspectos de la divulgación, se proveen viriones de AAV recombinante (rAAV), en donde estos viriones de rAAV comprenden una proteína variante de la cápside como se describe en la presente, en donde los viriones de rAAV presentan infectividad aumentada de uno o más tipos de células de la retina (por ejemplo una célula fotorreceptora (por ejemplo bastones; conos), una célula ganglionar de la retina (RGC), una célula gliales (por ejemplo una célula glial de Müller, una célula de la microglia), una célula bipolar, una célula amácrina, una célula horizontal, y/o una célula del epitelio pigmentario de la retina) en relación a la infectividad de la célula de la retina por un virión de AAV que comprende una correspondiente proteína de la cápside de AAV parental sin modificar. En algunas formas de realización, el virión de rAAV presenta una infectividad aumentada de todas las células de la retina en relación al virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV parental. En otras formas de realización, el virión de rAAV presenta infectividad aumentada de ciertos tipos de células de la retina, pero no de otras, en relación al virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV parental. Dicho de otra forma, el virión de rAAV presenta una infectividad aumentada que es preferencial contra ciertos tipos de células de la retina, pero no contra otros, por ejemplo el rAAV demuestra una infectividad preferiblemente aumentada de uno o más tipos de células seleccionados entre células fotorreceptoras, células ganglionares de retina, células gliales, células bipolares, células amácrinas, células horizontales, y/o células del epitelio pigmentario de la retina, pero no demuestra infectividad aumentada 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 para un ARN que codifica para un polipéptido. En otras de dichas formas de realización, la secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica para un ARN que no codifica para un polipéptido, por ejemplo la secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica para un agente de ARN de interferencia, un ARN guía para una nucleasa, etc.

[0014] También se proveen en la presente composiciones farmacéuticas que comprenden los viriones de rAAV infecciosos de la presente y un transportador farmacéuticamente aceptable.

[0015] También se provee el uso de un virión de rAAV que comprende una proteína variante de la cápside como se describe en la presente en un método para administrar un ácido nucleico heterólogo a una célula diana (tal como una célula de la

retina) mediante el contacto de la célula diana con el virión de rAAV. En algunas formas de realización, la célula diana está en un sistema *in vivo*, tal como en el ojo de un individuo que requiere tratamiento para una enfermedad ocular. En otras formas de realización, la célula diana está en un sistema *in vitro*.

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

[0017] También se provee un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica para una proteína variante de la cápside de AAV como se describe en la presente y una célula huésped que comprende el ácido nucleico aislado. En aún otras formas de realización, el ácido nucleico aislado y/o célula huésped aislada comprenden el rAAV.

[0018] En algunos aspectos, la proteína variante de la cápside de AAV comprende una inserción de entre aproximadamente 5 aminoácidos y aproximadamente 20 aminoácidos (un “péptido heterólogo”, o “inserción de péptido”) en el bucle GH de la proteína de la cápside, en relación a la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental, en donde la proteína variante de la cápside, cuando está presente en un virión de AAV, confiere infectividad aumentada de una célula de la retina en comparación con la infectividad de una célula de la retina por parte de un virión de AAV que comprende la correspondiente proteína de la cápside del AAV parental. En algunas formas de realización, el péptido comprende la secuencia que se selecciona 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), 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 consiste esencialmente en la secuencia que se selecciona 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), 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 variante de la cápside de AAV comprende una o más sustituciones de aminoácido relacionadas con la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental, en donde la proteína variante de la cápside, cuando está presente en un virión de AAV, confiere infectividad aumentada de una célula de la retina en comparación con la infectividad de una célula de la retina por parte de un virión de AAV que comprende la correspondiente proteína de la cápside del AAV parental.

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

[0020] En la presente también se describe una proteína variante de la cápside de AAV que comprende el péptido heterólogo LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) y una sustitución P34A en relación a AAV2. En algunas formas de realización relacionadas, en la presente se divulga un AAV recombinante infeccioso que comprende una proteína variante de la cápside de AAV por lo menos 90% idéntica a la secuencia como se describe en la SEQ ID NO:42 y un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia que codifica para un inhibidor de VEGF, preferiblemente un

inhibidor de VEGFa, y una composición farmacéutica que comprende al mismo. En algunas formas de realización, la secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica para un inhibidor de VEGF se selecciona de una secuencia que codifica para Aflibercept, Ranibizumab, una versión de cadena individual de Ranibizumab (sc-Ranibizumab LH o HL), Brolucizumab, sc-Ranibizumab fusionado al dominio Fc de IgG (sc-Ranibizumab-Fc), o Brolucizumab fusionado al dominio Fc de IgG (Brolucizumab-Fc). En algunas formas de realización relacionadas, el AAV recombinante comprende un ácido nucleico heterólogo que comprende dos o más secuencias, cada una de las cuales codifica para un inhibidor de VEGFa (por ejemplo una primera secuencia que codifica para Aflibercept y una segunda secuencia que codifica para Brolucizumab). En formas de realización preferidas, la secuencia de ácido nucleico heterólogo tiene una secuencia de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 65, 67, 69, 70, 72, 74, 76 o una secuencia por lo menos 90% idéntica a la misma. En otras formas de realización relacionadas, se provee un método para tratar a un paciente con una enfermedad ocular asociada con niveles intraoculares elevados de VEGFa, que comprende administrar al paciente, preferiblemente mediante una inyección intravítrea, una cantidad eficaz de un AAV recombinante infeccioso que comprende una proteína variante de la cápside de AAV por lo menos 90% idéntica a la secuencia como se describe en la SEQ ID NO:42 y un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia que codifica para un inhibidor de VEGF.

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

[0022] En la presente también se describen métodos para la elaboración y/o administración de un rAAV que comprende una cápside variante de AAV como se describe en la presente. Además, en la presente se proveen kits que comprenden un rAAV que comprende una cápside variante de AAV como se describe en la presente y para usar en los métodos descritos en la presente.

[0023] En otras formas de realización, el virión de AAV que comprende la proteína variante de la cápside de los párrafos precedentes puede incorporar cualquiera de las formas de realización precedentes o descritas posteriormente. De hecho, se aprecia que también se pueden proveer ciertas características de la invención, que se describen, con el propósito de claridad, en el contexto de formas de realización

separadas, en combinación con una forma de realización individual. Por el contrario, también se pueden proveer diferentes características de la invención, que se describen, con el fin de la brevedad, en el contexto de una forma de realización individual, o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las formas de realización que se relacionan con la invención están abarcadas específicamente por la invención y se describen en la presente como si cada una de las combinaciones fueran descritas de manera individual y explícita. Además, todas las subcombinaciones de las diferentes formas de realización y elementos de las mismas también están abarcadas específicamente por la invención y se describen en la presente como si cada una de dichas subcombinaciones fueran descritas de manera individual y explícita en la presente.

[0024] La síntesis de la invención no tiene como intención definir las reivindicaciones ni tiene como intención limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

[0025] Otras características y ventajas de la invención descrita en la presente resultarán evidentes a partir de las siguientes **Figuras**, Descripción detallada y las reivindicaciones.

[0026] Antes de describir los métodos y composiciones de la presente, se debe comprender que esta invención no se limita a un método o composición particular descrito y como tal puede variar. También se debe comprender que la terminología utilizada en la presente tiene el propósito de describir formas de realización particular solamente, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención solo estará limitado por las reivindicaciones anexas.

[0027] La invención descrita en la presente se ilustra en las figuras y en la memoria descriptiva. Sin embargo, si bien se ilustran formas de realización particulares en las figuras, no existe una intención de limitar la invención a la forma de realización o formas de realización específicas ilustradas y/o descritas. En su lugar, la invención descrita en la presente tiene como intención abarcar todas las modificaciones, construcciones alternativas, y equivalentes que caen dentro del espíritu y alcance de la invención. De este modo, las figuras tienen como intención ser ilustrativas y no restrictivas.

[0028] En los casos en que se provee un rango de valores, ha de comprenderse que también queda divulgado específicamente cada valor intermedio, hasta el décimo de la unidad del límite inferior a menos que el contexto indique

claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese rango. Cada rango más pequeño entre cualquier valor mencionado o valor intermedio de un rango mencionado y cualquier valor mencionado o intermedio del rango mencionado, está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños independientemente pueden estar incluidos o excluidos del rango, y cada rango en donde cualquiera, ninguno o ambos límites están incluidos en los rangos más pequeños, también está abarcado dentro de la invención, a excepción de cualquier límite específicamente excluido del rango mencionado. Cuando el rango mencionado incluye uno o ambos de los límites, los rangos que excluyen a uno o a ambos de dichos límites incluidos, también están incluidos en la invención.

[0029] A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que el comúnmente comprendido por los expertos en la materia al que pertenece esta invención. Aunque se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los que se describen en la presente para la práctica o la prueba de la presente invención, ahora se describen algunos métodos y materiales potenciales y preferidos. Todas las publicaciones que se mencionan en la presente se incorporan a la presente a modo de referencia para divulgar y describir los métodos y/o materiales en conexión con las publicaciones que se citan. Ha de comprenderse que en caso de que exista una contradicción, la presente divulgación sustituye a cualquier divulgación de una publicación incorporada.

[0030] Como será evidente para los expertos en la materia ante la lectura de esta divulgación, cada una de las formas de realización individuales que se describen y se ilustran en la presente tiene componentes y características discretas que se pueden separar o combinar fácilmente con las características de cualquiera de las otras varias formas de realización sin alejarse del alcance y espíritu de la presente invención. Cualquier método mencionado puede llevarse a cabo en el orden de eventos mencionado o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

[0031] Ha de notarse que, como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “uno/una”, “un”, y “el/la” incluyen a los referentes en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, 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 equivalentes de las mismas conocidas para los expertos en la materia, y etcétera. También ha de notarse que las

reivindicaciones pueden redactarse excluyendo cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de dicha terminología exclusiva tal como “únicamente”, “solo” y similares en conexión con la recitación de los elementos de reivindicación, o el uso de una limitación “negativa”.

[0032] Las publicaciones que se mencionan en la presente se proveen únicamente por su divulgación previa a la fecha de presentación de la presente solicitud. No existe nada en la presente que se interprete como una admisión de que la presente invención no tenga derecho a anteceder dicha publicación en virtud de la invención previa. Además, las fechas de publicación provistas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales, las cuales no necesitan confirmarse en forma independiente.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LAS FIGURAS

[0033] La invención se comprenderá mejor a partir de la siguiente descripción detallada al leerla en conjunto con las figuras acompañantes. El archivo de patente o solicitud contiene por lo menos una figura ejecutada en color. Las copias de esta publicación de patente o de solicitud de patente con una o más figuras en color serán provistas por la Oficina ante el requerimiento y pago de las tasas necesarias. Se enfatiza que, de acuerdo con la práctica común, las diversas características de las figuras no están representadas a escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características están ampliadas o reducidas en forma arbitraria con propósitos de clarificación. Dentro de las representaciones se incluyen las siguientes figuras.

[0034] En la **Figura 1** se representan formas de realización de una metodología de evolución dirigida. El Paso (a) representa la generación de una biblioteca de cápsides virales que comprende combinaciones de técnicas de mutación de ADN y genes *cap*. El Paso (b) representa el empaquetamiento de los virus de manera que cada partícula viral está compuesta por una cápside mutante que rodea el gen *cap* que codifica para esa cápside, y purificada. Luego se coloca la biblioteca de cápsides bajo presión de selección *in vitro* o *in vivo*. En este aspecto de la tecnología de evolución dirigida, se recolectan tejidos o material celular de interés para el aislamiento de las variantes de AAV que han infectado en forma exitosa esa diana, y se recuperan los virus exitosos. El Paso (c) representa la Etapa 1 de enriquecimiento de clones exitosos a través de selección repetitiva. El Paso (d) representa la Etapa 2 de enriquecimiento de genes *cap* seleccionados que se someten a rediversificación y pasos adicionales de selección para incrementar en forma iterativa la aptitud del virus. El Paso (e) representa

las variantes, identificadas como hallazgos durante las Etapas de Selección de Vectores 1 y 2, las cuales se elaborarán como vectores AAV recombinantes y se caracterizarán para estudiar el nivel de transducción de diversos tipos celulares y dianas tisulares. Debido a la naturaleza del proceso de evolución dirigida de AAV, las variantes que se divulgan en la presente tienen una capacidad demostrada para transducir las células de la retina y administrar un genoma (el genoma que codifica para el gen *cap* variante) durante el proceso de selección.

[0035] En la **Figura 2** se provee un esquema de montaje plano de retina que muestra dónde se amplifican las muestras de los genomas virales específicos, y se recolectan a lo largo de un área amplia de la retina.

[0036] En la **Figura 3** se muestra una amplificación por PCR de genomas virales de tejidos de la retina de la capa de células ganglionares (GCL), la capa nuclear interna (INL), la capa nuclear externa/de fotorreceptores (ONL), y la capa de epitelio pigmentario de la retina (RPE) de una ronda de selección representativa. Se inyectaron tanto el ojo derecho (imagen superior) como el ojo izquierdo (imagen inferior) con la biblioteca. Se tomaron muestras de retina interna (int), retina media (medio), y retina externa/periférica (ext). Las bandas dentro de las cajas rojas representan la amplificación exitosa de genomas virales.

[0037] En la **Figura 4A-4D** se muestra la frecuencia de motivos dentro del análisis de secuenciación. En la Figura 4A se provee la Ronda 3 del análisis de secuenciación. En la Figura 4B se provee la Ronda 4 del análisis de secuenciación. En la Figura 4C se provee la Ronda 5 del análisis de secuenciación. En la Figura 4D se provee la Ronda 6 del análisis de secuenciación.

[0038] En la **Figura 5** se provee un modelo tridimensional representativo de AAV2 que contiene un heptámero aleatorio después del aminoácido 587.

[0039] En la **Figura 6A-6W** se provee un alineamiento de las SEQ ID NOS:1-11 de AAV de tipo salvaje que muestra las localizaciones de aminoácido entre los serotipos de tipo salvaje (de origen natural) AAV1, AAV2, AAV3A, AAV3B, y AAV4-10 y a lo largo de los mismos.

[0040] En la **Figura 7** se proveen imágenes de fluorescencia de fondo tomadas con una Heidelberg SpectralisTM de la retina de un mono verde africano después de la administración intravítrea de 2×10^{11} genomas de vector (vg) de AAV2 que porta un transgén de GFP bajo el control del promotor de CMV

(AAV2.CMV.GFP). Las imágenes se tomaron en estado basal (A) y a los 14 días (B), 28 días (C), y 42 días (D) después de la inyección.

[0041] En la **Figura 8** se proveen imágenes de fluorescencia de fondo tomadas con una Heidelberg Spectralis™ de la retina de un mono verde africano después de la administración intravítrea de 2×10^{11} genomas de vector (vg) de la nueva variante de AVV LAISDQTKHA+P34A que administra un transgén de GFP bajo el control del promotor de CMV (LAISDQTKHA+P34A.CMV.GFP). Las imágenes se tomaron en estado basal (A) y a los 14 días (B), 28 días (C), y 42 días (D) después de la inyección.

[0042] En la **Figura 9** se proveen imágenes de fluorescencia de fondo tomadas con una Heidelberg Spectralis™ de la retina de monos cinomolgos después de la administración intravítrea de la nueva variante de AVV 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, se fotografió a los 14 días (A1), 21 días (A2), y 28 días (A3) después de la inyección. (B) La retina de un mono inyectado por vía intravítrea con 1×10^{12} vg de vector, se fotografió a los 14 días (B1) y 21 días (B2) después de la inyección.

[0043] En las **Figuras 10A-10E** se proveen los resultados del análisis inmunohistoquímico de la retina de un mono inyectado por vía intravítrea con 1×10^{12} vg de la nueva variante de AVV LAISDQTKHA+P34A que administra un transgén de GFP bajo el control del promotor CAG, realizado tres semanas después de la inyección. Toda la inmunohistoquímica se provee junto con la correspondiente imagen de fluorescencia de fondo, con una caja roja para indicar el lugar aproximado de la retina donde se llevó a cabo el análisis. **Figura 10A:** se observó una transducción robusta del epitelio pigmentario de la retina (RPE) y de fotorreceptores usando un anticuerpo específico contra GFP (color rojo). Se muestra en color blanco la inmunotinción de fotorreceptores en cono usando un anticuerpo anti-opsina M/L. **Figuras 10B y 10C:** se observó una transducción robusta de fotorreceptores en bastones y conos (**Figura 10B**) y RPE (**Figura 10C**) por fluorescencia directa de EGFP (color verde) y por inmunohistoquímica usando un anticuerpo específico contra GFP (color rojo). Los melanosomas de las RPE aparecen en la imagen con color negro. **Figura 10D:** se observó la transducción de los fotorreceptores en cono (identificados por opsina M/L, color blanco) y las células ganglionares de la retina (RGC) dentro de la fóvea y

alrededor de la misma por fluorescencia directa de EGFP (color verde) y por inmunohistoquímica usando un anticuerpo específico contra GFP (color rojo). Las imágenes de los paneles medios tienen una alta magnificación (63X) del área indicada por una caja de color blanco en el panel izquierdo. **Figura 10E:** se observó la transducción de las células ganglionares de la retina (RGC) y la capa de células ganglionares de la retina por fluorescencia directa de EGFP (paneles derechos, color verde; el panel izquierdo inferior es una magnificación 63X del panel derecho superior); en el panel izquierdo superior se muestra la región bajo iluminación de campo brillante.

[0044] En las **Figuras 11A-11F** se proveen datos de la transducción de células del epitelio pigmentario de la retina humana (RPE) *in vitro* mediante el virus AAV recombinante que comprende la nueva variante de cápside de AVV LAISDQTKHA+P34A y un transgén de GFP bajo el control del promotor CAG. Las células que se diferenciaron a células RPE a partir de una línea de células madre embrionarias humanas (**Figuras 11A y 11C**) o a partir de células madre pluripotentes inducidas derivadas de fibroblastos humanos (FB-iPSC) (**Figuras 11B y 11D**) se infectaron con la nueva variante de AVV LAISDQTKHA+P34A.CAG.GFP o el control de tipo salvaje 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 nueva variante de cápside de AVV (paneles izquierdos) transduce las células RPE mejor que la cápside de AAV2 de tipo salvaje (paneles derechos). **Figuras 11C y 11D:** la cuantificación del porcentaje de células RPE positivas para GFP en cada cultivo por citometría de flujo revela que la nueva variante de cápside de AVV provee una mejora significativa dependiente de la dosis en el número de células transducidas por sobre la cápside de AAV2 de tipo salvaje independientemente de la fuente de células. **Figuras 11E y 11F:** la cuantificación de la cantidad de GFP en cada cultivo por transferencia Western revela que la nueva variante de AVV provee una mejora significativa de la expresión del transgén por sobre la cápside de tipo salvaje independientemente de la fuente de células.

[0045] En las **Figuras 12A-12F** se representan formas de realización de proteínas anti-VEGF. En la **Figura 12A** se representa el diseño del Aflibercept, el cual consiste en el péptido señal de Flt1 humano, el dominio 2 de VEGFR1, y el dominio 3 de VEGFR2 fusionados a la región Fc de la IgG1 humana. En las **Figuras 12B-C** se representan los diseños de Ranibizumab, los cuales incluyen un conector proteico flexible para convertir el fragmento de unión a antígeno (Fab) de dos cadenas a un Fab

de cadena individual (scFab). En la **Figura 12B** se representa la forma Liviana-Pesada (LH), que consiste en el péptido señal de la cadena liviana kappa de Ig humana, los dominios variable de cadena liviana, constante de cadena liviana, variable de cadena pesada y constante de cadena pesada 1 del Ranibizumab conectados por el péptido flexible. En la **Figura 12C** se representa la forma Pesada-Liviana (HL), que es similar excepto porque el péptido señal deriva de los dominios de cadena pesada de IgG humana y los dominios pesado y liviano están en los lados opuestos del conector en comparación con la forma LH. En la **Figura 12D** se representa el diseño del Brolucizumab, el cual incluye los dominios variable de cadena liviana y variable de cadena pesada conectados por un péptido flexible. En la **Figura 12E** se representa el diseño de LH-Fc de sc-Ranibizumab que consiste en la forma LH de scFab fusionada a la región Fc de la IgG1 humana. En la **Figura 12F** se representa el diseño de Brolucizumab-Fc, que consiste en el Brolucizumab fusionado a la región Fc de la IgG1 humana. Las rayas de color rojo representan las regiones determinantes de complementariedad (CDR). Se optimizaron los codones de los genes para mejorar la expresión a partir de células humanas y se sintetizaron en GeneArt o GenScript y se insertaron en el vector pAAV-CAG-SV40 pA entre el promotor CAG y la señal de poliA del SV40.

[0046] En las **Figuras 13A-B** se muestra el resultado de un ELISA para detectar las proteínas que se unen a VEGF. En la **Figura 13A** se muestra que se detectó actividad de unión a VEGF en el medio de células HEK293T transfectadas con los plásmidos de expresión de Aflibercept (SEQ ID NO:65) o Ranibizumab de cadena individual (sc) (SEQ ID NOs:67, 69, y 70) pero no a partir de transfecciones control o células transfectadas con un vector de expresión de GFP. En la **Figura 13B** se muestra que se detectó actividad de unión a VEGF en el medio de células HEK293T transfectadas con los plásmidos de expresión de Aflibercept (SEQ ID NO:65), sc-Ranibizumab LH1 (SEQ ID NO:69), o Brolucizumab (SEQ ID NO:74) pero no a partir de las transfectadas con un vector de expresión de GFP. La señal con Brolucizumab es muy baja, probablemente debido al malo reconocimiento mediante el anticuerpo de detección. Las barras de error representan la desviación estándar de pocillos transfectados por cuadruplicado.

[0047] En las **Figuras 14A-B** se proveen transferencias Western representativas de medio de células HEK293T transfectadas con construcciones anti-VEGF. En la **Figura 14A** se muestran plásmidos de expresión de Aflibercept (SEQ ID

NO:65) o sc-Ranibizumab (SEQ ID NOs:67, 69, y 70). Tanto la proteína clínica Eylea de como la muestra de Aflibercept se reducen para separar las mitades del dímero, de masa molecular aparente de 58 kD (incluyendo la glicosilación). La proteína clínica Lucentis se reduce a cadenas liviana y pesada separadas de 24 kD, mientras que las proteínas del sc-Ranibizumab no se separan y migran a aproximadamente 48 kD. Hay presente una cantidad mayor de las formas LH de la proteína en comparación con la forma HL de la proteína, en consistencia con la cuantificación proteica obtenida mediante ELISA. En la **Figura 14B** se muestran los plásmidos de expresión de Aflibercept (SEQ ID NO:65), sc-Ranibizumab LH1 (SEQ ID NO:69), o Brolucizumab (SEQ ID NO:74). La señal con Brolucizumab es baja, probablemente debido a un mal reconocimiento por parte del anticuerpo de detección. La proteína migra a la masa molecular correcta de 26 kD. No hubo señal en ninguno de los controles de transfección ni en la muestra control negativa para GFP.

[0048] En las **Figuras 15A-B** se muestra el resultado de un ELISA de competición para detectar VEGF libre después de la incubación con medio de células HEK293T transfectadas con construcciones anti-VEGF. En la **Figura 15A** se muestran los plásmidos de transfección de Aflibercept (SEQ ID NO:65) o sc-Ranibizumab (SEQ ID NOs:67, 69, y 70). Las curvas de inhibición de las cuatro proteínas anti-VEGF de las muestras transfectadas fueron muy similares a las proteínas de comparación clínicas Eylea y Lucentis. Aflibercept y Eylea compitieron por el VEGF más fuertemente que las variantes de sc-Ranibizumab y Lucentis. Las tres formas de sc-Ranibizumab fueron casi idénticas. En la **Figura 15B** se muestran los plásmidos de expresión de Aflibercept (SEQ ID NO:65), sc-Ranibizumab LH1 (SEQ ID NO:69), o Brolucizumab (SEQ ID NO:74). No hubo actividad de competición a partir de la muestra control negativa para GFP. Las barras de error representan la desviación estándar de pocillos transfectados por duplicado.

[0049] En la **Figura 16** se muestra el resultado de un ensayo de neutralización de VEGF celular. El ensayo usa células HEK293 que expresan proteínas de fusión de receptor de VEGF/beta-galactosidasa que producen beta-galactosidasa activa ante la unión a VEGF. Las células se incuban con mezclas de VEGF y diversas diluciones de medio de células HEK293T transfectadas con los plásmidos de expresión de Aflibercept (SEQ ID NO:65) o sc-Ranibizumab (SEQ ID NO:69). Las curvas de inhibición de las proteínas anti-VEGF de las muestras transfectadas demuestran que las proteínas anti-VEGF neutralizan la actividad del VEGF a niveles iguales a las proteínas

de comparación clínicas. Las barras de error representan la desviación estándar de pocillos de ensayo por duplicado.

[0050] En las **Figuras 17A-B** se muestra el resultado de un ensayo de neutralización de VEGF celular llevado a cabo con volúmenes iguales de medio de células HEK293T transfectadas con plásmidos anti-VEGF. En la **Figura 17A** se muestran los plásmidos de expresión de GFP, Aflibercept (SEQ ID NO:65), sc-Ranibizumab HL (SEQ ID NO:67), o sc-Ranibizumab LH1 (SEQ ID NO:69). Todas las construcciones anti-VEGF evaluadas neutralizaron al VEGF. En la **Figura 17B** se muestran los plásmidos de expresión de GFP, Aflibercept (SEQ ID NO:65), sc-Ranibizumab LH1 (SEQ ID NO:69), y Brolucizumab (SEQ ID NO:74). Todas las construcciones anti-VEGF evaluadas neutralizaron al VEGF. Hubo un leve efecto de matriz a partir de la muestra control de GFP a las diluciones ensayadas. Las barras de error representan la desviación estándar de pocillos transfectados por duplicado.

[0051] En la **Figura 18** se muestra el resultado de un ELISA para detectar VEGF en el medio de células RPE transfectadas con los plásmidos de expresión de Aflibercept (SEQ ID NO:65) o sc-Ranibizumab (SEQ ID NOs:67, 69, y 70). Se observó una reducción de los niveles de VEGF tanto por la expresión de Aflibercept como por la expresión de sc-Ranibizumab. El efecto sobre los niveles de VEGF por parte de las tres formas de sc-Ranibizumab fue similar. Las barras de error representan la desviación estándar de pocillos transfectados por cuadruplicado.

[0052] En la **Figura 19** se muestra el resultado de un ELISA para detectar VEGF en medio recolectado de células RPE seis o diez días después de la transducción con la cápside R100 (que tiene la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:42) que expresa los transgenes de Aflibercept (SEQ ID NO:65), sc-Ranibizumab (SEQ ID NOs:67 y 69), o Brolucizumab (SEQ ID NO:74). El nivel endógeno de VEGF indicado por las células transducidas con un vector control de GFP fue entre 4.500 y 8.300 pg/ml. La transducción con todos los vectores anti-VEGF resultó en niveles indetectables de VEGF en el medio. Las barras de error representan la desviación estándar de pocillos transducidos por cuadruplicado.

[0053] En la **Figura 20** se muestra el resultado de un ELISA para detectar proteínas que se unen a VEGF en medio recolectado de células RPE seis o diez días después de la transducción con la cápside R100 (que tiene la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:42) que expresa transgenes anti-VEGF. Se detectó actividad de unión a VEGF en el medio de células transducidas con los vectores de

expresión de Aflibercept (SEQ ID NO:65), sc-Ranibizumab (SEQ ID NOs:67 y 69), o Brolucizumab (SEQ ID NO:74), pero no a partir de las transducidas con un vector de expresión de GFP. La señal con Brolucizumab es muy baja, probablemente debido a un mal reconocimiento por parte del anticuerpo de detección. Las barras de error representan la desviación estándar de pocillos transducidos por cuadruplicado.

[0054] En la **Figura 21** se provee una transferencia Western representativa de medio recolectado a partir de células RPE seis o diez días después de la transducción con la cápside R100 (que tiene la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:42) que expresa los transgenes anti-VEGF. Tanto la proteína clínica Eylea como la muestra de Aflibercept (SEQ ID NO:65) se reducen para separar las mitades del dímero, de masa molecular aparente de 60 kD (incluyendo la glicosilación), tal como lo indica la flecha de color negro. No hubo banda con movilidad correcta en la muestra control negativa para GFP. La proteína clínica Lucentis se reduce a cadenas liviana y pesada separadas de 24 kD, mientras que la HL y la LH del sc-Ranibizumab (SEQ ID NOs:67 y 69) no se separan y migran a masa molecular aparente de 58 kD, tal como lo indica la flecha de color gris. La señal con Brolucizumab (SEQ ID NO:74) es baja, probablemente debido a un mal reconocimiento por parte del anticuerpo de detección. La proteína migra a la masa molecular correcta de 26 kD, tal como lo indica la flecha punteada.

[0055] En la **Figura 22** se muestra el resultado de un ELISA de competición para detectar VEGF libre después de la incubación con medio recolectado de células RPE seis o diez días después de la transducción con la cápside R100 (que tiene la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:42) que expresan los transgenes anti-VEGF. Todas las construcciones anti-VEGF compitieron por VEGF. No hubo actividad de competición a partir de la muestra control negativa para GFP. Los niveles de VEGF libre son más altos en las diluciones más bajas debido al VEGF endógeno producido por las células RPE. Las barras de error representan la desviación estándar de pocillos de ensayo por duplicado.

[0056] En la **Figura 23** se muestra el resultado de un ensayo de neutralización de VEGF celular llevado a cabo con medio recolectado a partir de células RPE seis días después de la transducción con la cápside R100 (que tiene la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:42) que expresan los transgenes anti-VEGF. Todas las construcciones anti-VEGF evaluadas neutralizaron al VEGF. No se observó neutralización del VEGF con el medio de la transducción control de GFP.

Las barras de error representan la desviación estándar de pocillos de ensayo por duplicado.

DEFINICIONES

[0057] A menos que se defina de otra manera, todos los términos científicos y técnicos que se usan en la presente tienen el mismo significado comúnmente comprendido por los expertos en la materia a la que pertenece esta tecnología.

[0058] El virus adenoasociado es un parvovirus no patogénico compuesto por un genoma a ADN de hebra individual de 4,7 kb dentro de una cápside icosaédrica sin envoltura. El genoma contiene tres marcos abiertos de lectura (ORF) flanqueados por repeticiones terminales invertidas (ITR) que funcionan como origen de replicación y señal de empaquetamiento viral. El ORF de *rep* codifica para cuatro proteínas no estructurales que tienen roles en la replicación, regulación transcripcional, integración específica de sitio y ensamblaje de los viriones virales. El ORF de *cap* codifica para tres proteínas estructurales (VP 1-3) que se ensamblan para formar una cápside viral de 60 unidades. Finalmente, el ORF presente como marco de lectura alternativo dentro del gen *cap* produce la proteína activadora de ensamblaje (AAP), una proteína viral que localiza a las proteínas de la cápside de AAV en el nucléolo y funciona en el proceso de ensamblaje de cápsides.

[0059] Existen varios serotipos de origen natural (“de tipo salvaje”) y más de 100 variantes conocidas de AAV, cada una de las cuales difiere en la secuencia de aminoácidos, en particular dentro de las regiones hipervariables de las proteínas de la cápside, y por lo tanto en sus propiedades de administración de genes. No se ha asociado a los AAV con ninguna enfermedad humana, haciendo al AAV recombinante un atractivo para aplicaciones clínicas.

[0060] Para los propósitos de la divulgación en la presente, el término “AAV” es una abreviatura de virus adenoasociado, que incluye, sin limitación, el virus mismo y derivados del mismo. Excepto cuando se indica de otra manera, el término se refiere a todos los subtipos o serotipos y a las formas competentes para la replicación y recombinantes. El término “AAV” incluye, sin limitación, 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 infectan primates, "AAV no primate" se refiere a AAV que infectan mamíferos no primates, "AAV bovino" se refiere a AAV que infectan a mamíferos bovinos, etc.

[0061] Las secuencias genómicas de diferentes serotipos de AAV, así como las secuencias de las repeticiones terminales (TR) nativas, proteínas Rep, y subunidades de la cápside son conocidas en la materia. Dichas secuencias se pueden encontrar en la literatura o en bases de datos públicas tales como GenBank. Véase, por ejemplo, los Números de Acceso a 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 a modo de referencia a la presente para los contenidos sobre secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de AAV. Véase también, por ejemplo, Srivistava y col. (1983) J. Virology 45:555; Chiorini y col. (1998) J. Virology 71:6823; Chiorini y col. (1999) J. Virology 73: 1309; Bantel-Schaal y col. (1999) J. Virology 73:939; Xiao y col. (1999) J. Virology 73:3994; Muramatsu y col. (1996) Virology 221:208; Shade et. al. (1986) J. Virol. 58:921; Gao y col. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99: 11854; Moris y col. (2004) Virology 33:375-383; publicaciones de patente internacional WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; y la Patente de los EE.UU. No. 6.156.303.

[0062] Las secuencias de proteínas cap (cápside) de existencia natural asociadas con los serotipos AAV son conocidas en la materia e incluyen aquellas 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 variante de la cápside de AAV" o "variante de AAV" se refieren a una proteína de la cápside de AAV que comprende una secuencia de aminoácidos que incluye por lo menos una modificación o sustitución (que incluye eliminación, inserción, mutación puntual, etc.) relacionada con una secuencia de proteína de la cápside de AAV de existencia natural o "de tipo salvaje", por ejemplo como se describe en la SEQ ID NO:1-12 en la presente. Una proteína variante 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 salvaje, 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 salvaje, por ejemplo, 98% o 99% de identidad con la proteína de la cápside de tipo salvaje. Una proteína variante de la cápside de AAV puede no ser una proteína de la cápside de tipo salvaje.

[0063] Para los propósitos de la divulgación en la presente, "virión de AAV" o "partícula viral de AAV" se refiere a una partícula viral compuesta por al menos una proteína de la cápside de AAV y un polinucleótido encapsidado de AAV.

[0064] Para los propósitos de la divulgación en la presente, el término "rAAV" es una abreviatura que se refiere a un virus adenoasociado recombinante. "Recombinante", como se aplica a un polinucleótido se refiere a que el polinucleótido es el producto de diferentes combinaciones de pasos de clonado, restricción o ligado, y otros procedimientos que resultan en una construcción que es diferente de un polinucleótido encontrado en la naturaleza. Un virus recombinante es una partícula viral que comprende un polinucleótido recombinante. Los términos respectivamente incluyen replicados de la construcción del polinucleótido original y progenie de la construcción del virus original.

[0065] El término "vector rAAV" abarca viriones de rAAV (es decir, partículas virales de rAAV) (por ejemplo, un virión de rAAV infeccioso), que por definición incluyen un polinucleótido de rAAV; y también abarca polinucleótidos que codifican para rAAV (por ejemplo, un polinucleótido de hebra simple que codifica para rAAV (ss-rAAV); un polinucleótido de hebra doble que codifica para rAAV (ds-rAAV), por ejemplo, plásmidos que codifican para rAAV; y similares).

[0066] Si un virión de AAV comprende un polinucleótido heterólogo (es decir un polinucleótido diferente de un genoma de AAV de tipo salvaje, por ejemplo, un transgén a ser administrado a una célula diana, un agente ARNi o agente CRISPR a ser administrado a una célula diana, etc.), se lo refiere habitualmente como un "virión de AAV recombinante (rAAV)" o una "partícula viral de rAAV". En general, el polinucleótido heterólogo está flanqueado por al menos una, y en general por dos, secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV.

[0067] El término "empaquetamiento" se refiere a una serie de eventos intracelulares que resultan en el ensamblaje y encapsulamiento de una partícula de AAV. Los genes de AAV "*rep*" y "*cap*" se refieren a secuencias polinucleotídicas que

codifican para proteínas de replicación y encapsulamiento de los virus adenoasociados. Los genes *rep* y *cap* de AAV se denominan en la presente como "genes de empaquetamiento" de AAV.

[0068] El término "virus colaborador" para un AAV se refiere a un virus que permite que el AAV (por ejemplo un AAV de tipo salvaje) sea replicado y empaquetado por una célula de mamífero. En la materia se conoce una variedad de dichos virus colaboradores de AAV, que incluye adenovirus, herpesvirus y poxvirus tales como vacuna. Los adenovirus abarcan un número de diferentes subgrupos, a pesar de que el Adenovirus tipo 5 del subgrupo C es el más usado habitualmente. Se conocen varios adenovirus de origen humano, mamífero no humano y aviar y se encuentran disponibles de repositorios tales como la ATCC. Los virus de la familia herpes incluyen, por ejemplo, virus herpes simple (HSV) y virus Epstein-Barr (EBV), así como citomegalovirus (CMV) y virus de la seudorabia (PRV); que también se encuentran disponibles de los repositorios tales como la ATCC.

[0069] El término "función o funciones de virus colaborador" se refiere a la o las funciones codificadas en un genoma del virus colaborador que permite la replicación y empaquetamiento del AAV (junto con otros requerimientos para la replicación y empaquetamiento descritos en la presente). Como se describe en la presente, la "función de virus colaborador" puede ser provista de diferentes maneras, que incluyen la provisión de un virus colaborador o la provisión, por ejemplo, de secuencias polinucleotídicas que codifican para la o las funciones requisito a una célula productora en trans. Por ejemplo, se transfecta un plásmido u otro vector de expresión que comprende secuencias nucleotídicas que codifican para una o más proteínas adenovirales en una célula productora junto con un vector de rAAV.

[0070] El término virus o partícula viral "infecciosa" es uno que comprende una cápside viral ensamblada de manera competente y que tiene la capacidad de proveer un componente polinucleótido en una célula para la cual la especie viral es trófica. El término no necesariamente implica cualquier capacidad de replicación del virus. Los ensayos para contar las partículas virales se describen en varios lugares en esta divulgación y en la materia. La infectividad viral se puede expresar como la relación de partículas virales infecciosas a partículas virales totales. Los métodos para determinar la relación de partículas virales infecciosas a partículas virales totales son conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Grainger y col. (2005) Mol. Ther. 11: S337 (que

describe un ensayo de titulación de infectividad TCID₅₀); y Zolotukhin y col. (1999) Gene Ther. 6:973. Véanse también los Ejemplos.

[0071] El término "tropismo" como se usa en la presente se refiere al direccionamiento preferencial de un virus (por ejemplo, un AAV) por células de una especie de huésped particular o de tipos celulares particulares en una especie de huésped. Por ejemplo, un virus que puede infectar células del corazón, pulmón, hígado, y músculo tiene un tropismo más amplio (es decir, aumentado) en relación a un virus que solo puede infectar células de pulmón y músculo. El tropismo también puede incluir la dependencia de un virus en tipos particulares de moléculas de la superficie celular del huésped. Por ejemplo, algunos virus pueden infectar solo células con glicosaminoglicanos de superficie, mientras que otros virus pueden infectar solo células con ácido siálico (dichas dependencias se pueden ensayar usando diferentes líneas de células deficientes en clases particulares de moléculas como potenciales células huéspedes para la infección viral). En algunos casos, el tropismo de un virus describe las preferencias relativas del virus. Por ejemplo, un primer virus puede tener la capacidad de infectar todos los tipos celulares pero tiene mucho más éxito al infectar aquellas células con glicosaminoglicanos en superficie. Se puede considerar que un segundo virus tiene un tropismo (o idéntico) que el primer virus si el segundo virus también prefiere las mismas características (por ejemplo, el segundo virus también tiene más éxito al infectar aquellas células con glicosaminoglicanos en superficie), incluso si las eficacias de transducción absolutas no son similares. Por ejemplo, el segundo virus podría ser más eficaz que el primer virus para infectar cualquier tipo de célula dada, pero si las preferencias relativas son similares (o idénticas), se puede considerar aún que el segundo virus tiene un tropismo similar (o idéntico) que el primer virus. En algunas formas de realización, el tropismo de un virión que comprende una proteína variante de la cápside de AAV sujeto no está alterado en relación a un virión de origen natural. En algunas formas de realización, el tropismo de un virión que comprende una proteína variante de la cápside de AAV sujeto se expande (es decir, se amplía) en relación a un virión de origen natural. En algunas formas de realización, el tropismo de un virión que comprende una proteína variante de la cápside de AAV sujeto está reducido en relación a un virión de origen natural.

[0072] El término virus "competente para la replicación " (por ejemplo un AAV competente para la replicación) se refiere a un virus fenotípicamente de tipo salvaje que es infeccioso, y también tienen la capacidad ser replicado en una célula

infectada (es decir en presencia de un virus colaborador o funciones de virus colaborador). En el caso de AAV, la competencia de replicación en general requiere la presencia de genes de empaquetamiento de AAV funcionales. En general, los vectores rAAV como se describe en la presente son incompetentes para la replicación en células de mamífero (especialmente en células de humano) en virtud de la falta de uno o más genes de empaquetamiento de AAV. Habitualmente, dichos vectores rAAV carecen de cualquier secuencia de gen de empaquetamiento de AAV con el objetivo de minimizar la posibilidad de que se generen AAV competentes para la replicación por recombinación entre 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 referido como RCA) (por ejemplo, menos de aproximadamente 1 rcAAV por cada 10^2 partículas rAAV, menos de aproximadamente 1 rcAAV por cada 10^4 partículas rAAV, menos de aproximadamente 1 rcAAV por cada 10 partículas rAAV, menos de aproximadamente 1 rcAAV por cada 10^{12} partículas rAAV, o sin rcAAV).

[0073] El término "polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, que incluyen desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótidos, y pueden estar interrumpidos por componentes no nucleótidos. Si están presente, las modificaciones de la estructura de nucleótidos pueden ser impartidas antes o después del ensamblaje del polímero. El término polinucleótido, como se usa en la presente, se refiere tanto para moléculas de hebra doble como para de hebra simple. A menos que se especifique o se requiera de otra manera, cualquier forma de realización en la presente que comprenda un polinucleótido abarca la forma de hebra doble y cada una de las dos formas de hebra simple complementarias conocidas o predichas para construir la forma de hebra doble.

[0074] Un polinucleótido o polipéptido tiene un cierto porcentaje de "identidad de secuencia" con otro polinucleótido o polipéptido, en referencia a que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases o aminoácidos es el mismo que cuando se comparan las dos secuencias. La similitud de secuencia se puede determinar de varias maneras diferentes. Para determinar la identidad de secuencia, las secuencias se pueden alinear usando los métodos y programas de computación, que incluyen BLAST,

disponibles en internet en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Otro algoritmo de alineamiento es FASTA, disponible en el paquete Genetics Computing Group (GCG), de Madison, Wisconsin, EE.UU., una filial de propiedad exclusiva de Oxford Molecular Group, Inc. Otras técnicas para el alineamiento se describen en *Methods in Enzymology*, vol. 266: *Computer Methods Macromolecular Sequence Analysis* (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., una división de Harcourt Brace & Co., San Diego, California, EE.UU. Los programas de alineamiento que permiten no coincidencias en la secuencia son de particular interés. El Smith- Waterman es un tipo de algoritmo que permite no coincidencias en los alineamientos de secuencias. Véase *Meth. Mol. Biol.* 70: 173-187 (1997). Además, el programa GAP que utiliza el método de alineamiento de Needleman y Wunsch se puede utilizar para alinear secuencias. Véase *J. Mol. Biol.* 48: 443- 453 (1970).

[0075] El término "gen" se refiere a un polinucleótido que realiza una función de algún tipo en la célula. Por ejemplo, un gen que contiene un marco de lectura abierto que tiene la capacidad de codificar para un producto génico. Un ejemplo de un producto génico es una proteína, que se transcribe y traduce a partir 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 (ARNr), un ARN de transferencia (ARNt), un ARN no codificante (ARNnc), un ARN guía para nucleasas, etc., que se transcribe pero no se traduce.

[0076] El término "producto de expresión génica" o "producto génico" es una molécula que resulta de la expresión de un gen particular, como se define precedentemente. Los productos de expresión génica incluyen, por ejemplo, un polipéptido, un aptámero, un ARN de interferencia, un ARN mensajero (ARNm), un ARNr, un ARNt, un ARN no codificante (ARNnc), y similares.

[0077] EL término "agente ARNip" ("de interferencia pequeño" o "ARN de interferencia corto" (o ARNip)) es un dúplex de nucleótidos de ARN que está dirigido a un gen de interés (un "gen diana"). Un "ARN dúplex" se refiere a la estructura formada por el apareamiento complementario entre dos regiones de una molécula de ARN, que forman una región de ARN de hebra doble (ARNhd). El ARNip está "dirigido" a un gen en el cual la secuencia de nucleótidos de la parte dúplex del ARNip es complementaria a una secuencia de nucleótidos del gen diana. En algunas formas de realización, la longitud del dúplex de ARNip es menor que 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 entre 19 y 25 nucleótidos de longitud. En algunas formas de realización, el direccionamiento génico mediado por ARNip se logra mediante el uso de interferencia de ARN dirigida por ADN (ARNidd) que es una técnica de silenciamiento génico que utiliza construcciones de ADN para activar las vías de interferencia con ARN (ARNi) endógeno de la célula animal. Dichas construcciones de ADN se diseñan para que expresen los ARN de hebra doble autocomplementarios, habitualmente ARN de horquilla pequeños (ARNhp), que una vez procesados producen el silenciamiento de un gen o genes diana. Cualquier ARN, incluyendo ARNm endógenos o ARN virales, puede ser silenciado mediante el diseño de construcciones para expresar ARN de hebra doble complementario con el ARNm diana deseado. Así, la parte del ARN dúplex de un agente ARNip puede ser parte de una estructura de horquilla pequeña referida como ARNhp. Además de la parte dúplex, la estructura de horquilla puede contener una parte en bucle posicionada entre las dos secuencias que forman el dúplex. El bucle puede variar en longitud. En algunas formas de realización el bucle tiene 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 nucleótidos de longitud. La estructura en horquilla también puede contener partes sobreextendidas en 3' o 5'. En algunas formas de realización, la sobreextensión es una sobreextensión en 3' o 5' de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de longitud. En general, el nivel de producto de expresión (por ejemplo, ARNm, polipéptido, etc.) de un gen diana se reduce mediante un agente ARNip (por ejemplo, un ARNip, un ARNhp, etc.) que contiene secuencias nucleotídicas de hebra doble específicas que son complementarias con al menos un segmento de entre 19 y 25 nucleótidos de longitud (por ejemplo, una secuencia de entre 20 y 21 nucleótidos) del transcripto del gen diana, incluyendo la región no traducida (UT) 5', el ORF, o la región UT 3'. En algunas formas de realización, los ARN de interferencia pequeños tienen aproximadamente entre 19 y 25 nt de longitud. Véase, por ejemplo, las Solicitudes PCT WO 00/44895, WO 99/32619, WO 01/75164, WO 01/92513, WO 01/29058, WO 01/89304, WO 02/16620, y WO 02/29858; y la Publicación de Patente de los EE.UU. No. 2004/0023390 para descripciones de la tecnología de ARNip. El ARNip y/o ARNhp puede estar codificado 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.

[0078] El término “ARN antisentido” abarca ARN que es complementario con un producto de expresión génica. Por ejemplo, un ARN antisentido dirigido a un ARNm específico es un agente basado en ARN (o puede ser un ARN modificado) que es complementario con el ARNm, en donde la hibridización del ARN antisentido con el ARNm altera la expresión del ARNm (por ejemplo, al alterar la estabilidad del ARN, alterar la traducción del ARN, etc.). En "ARN antisentido" también se incluyen los ácidos nucleicos que codifican para un ARN antisentido.

[0079] Respecto a los “agentes CRISPR/Cas9”, el término “CRISPR” abarca sistemas asociados a repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente espaciadas/CRISPR (Cas) que evolucionaron para proveer bacterias y arqueas con inmunidad adaptativa contra virus y plásmidos mediante el uso de ARN de CRISPR (CrARN) para llevar a cabo el silenciamiento de los ácidos nucleicos invasores. La proteína Cas9 (o equivalente y/o variante funcional de la misma, es decir, proteína similar a Cas9) contiene de manera natural actividad endonucleasa de ADN que depende de la asociación de la proteína con dos moléculas de ARN de origen natural o sintéticas llamadas CrARN y tracrARN (también llamados ARN guía). En algunos casos, las dos moléculas están unidas covalentemente para formar una molécula individual (también llamada ARN guía simple ("ARNgs")). Por lo tanto, la proteína Cas9 o similar a Cas9 se asocia con ARN dirigido a ADN (en donde el término abarca la configuración de molécula del ARN de guía y la configuración de ARN guía de molécula simple), que activa la proteína Cas9 o similar a Cas9 y guía a la proteína a una secuencia de ácido nucleico diana.

[0080] Si la proteína Cas9 o similar a Cas9 retiene su función enzimática natural, escindiría el ADN diana para crear un corte en la hebra doble, que puede llevar a una alteración en el genoma (es decir, edición: eliminación, inserción (cuando un polinucleótido donante está presente), reemplazo, etc.), alterando de esta manera la expresión génica. Algunas variantes de Cas9 (en donde dichas variantes están abarcadas por el término similar a Cas9) han sido alteradas de tal manera que tienen una actividad de escisión de ADN disminuida (en algunos casos, escinden una hebra simple en lugar de ambas hebras de del ADN diana, mientras que en otros casos, tienen muy reducida la actividad de escisión no ADN). Las proteínas similares a Cas9 con actividad disminuida de escisión de ADN (incluso la actividad de escisión no ADN) igualmente pueden guiar a un ADN diana para bloquear la actividad ARN polimerasa. Como alternativa, la proteína Cas9 o similar a Cas9 se puede modificar mediante la fusión de

un dominio de activación de la transcripción VP64 a la proteína Cas9 y coadministrar la proteína de fusión con una proteína colaboradora MS2-P65-HSF1 y un ARN guía simple que comprende aptámeros MS2 ARN en el tetrabucle y tallo-bucle para formar un complejo mediador de activación sinérgica (Cas9-SAM) en la célula que activa la transcripción. Por lo tanto las proteínas similares a Cas9 inactivas enzimáticamente pueden ser dirigidas a una ubicación específica en un ADN diana mediante un ARN dirigido a ADN con el objetivo de bloquear o activar la transcripción del ADN diana. El término “agentes CRISPR/Cas9” como se usa en la presente abarca todas las formas de CRISPR/Cas9 como se describió precedentemente o como es conocido en la materia.

[0081] Se puede encontrar información detallada respecto a los agentes CRISPR, por ejemplo en (a) Jinek y col., *Science*. 2012 Aug 17;337(6096):816-21: "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity"; (b) Qi y col., *Cell*. 2013 Feb 28; 152(5): 1173-83: "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression", y (c) Solicitud de Patente de los EE.UU. número 13/842,859 y Solicitud PCT número PCT/US13/32589; las cuales se incorporan a la presente a modo de 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 para dicho agente), que comprende secuencias de origen natural y/o sintéticas, que se pueden usar en el sistema 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 de hebra simple, etc.; un polinucleótido donante; y similares).

[0082] El término “nucleasas dedos de cinc” (ZFN) se refiere a endonucleasas de ADN artificiales generadas por fusión de un dominio de unión a ADN dedos de cinc a un dominio de escisión de ADN. Las ZFN se pueden diseñar para que estén dirigidas a secuencias de ADN deseadas diana y esto permite que las nucleasas dedos de cinc escindan secuencias diana únicas. Cuando se introducen en una célula, las ZFN se pueden para editar el ADN diana en la célula (por ejemplo, el genoma de la célula) mediante la inducción de cortes en la hebra doble. Para más información sobre el uso de las ZFN, véase, por ejemplo: Asuri y col., *Mol Ther*. 2012 Feb; 20(2):329-38; Bibikova y col. *Science*. 2003 May 2;300(5620):764; Wood y col. *Science*. 2011 Jul 15;333(6040):307; Ochiai y col. *Genes Cells*. 2010 Aug; 15(8):875-85; Takasu y col., *Insect Biochem Mol Biol*. 2010 Oct; 40(10):759-65; Ekker y col, *Zebrafish* 2008 Summer; 5(2): 121-3; Young y col, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Apr

26;108(17):7052-7; Goldberg y col, Cell. 2010 Mar 5;140(5):678-91; Geurts y col, Science. 2009 Jul 24;325(5939):433; Flisikowska y col, PLoS One. 2011;6(6):e21045. doi: 10.1371/journal.pone.0021045. Epub 2011 Jun 13; Hauschild y col, Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul 19;108(29): 12013-7; y Yu y col, Cell Res. 2011 Nov; 21(1): 1638-40; las cuales se incorporan a la presente a modo de referencia por sus descripciones relacionadas con las ZFN. El término "agente ZFN" abarca una nucleasa dedos de cinc y/o un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una nucleasa dedos de cinc.

[0083] El término “nucleasa efectora similar al activador de transcripción” o agentes “TALEN” se refiere a nucleasas efectoras similares al activador de transcripción (TALEN) que son endonucleasas de ADN artificiales generadas por fusión de un dominio de unión a ADN efector TAL (similar al activador de la transcripción) a un dominio de escisión de ADN. Las TALEN se pueden diseñar fácilmente para que se unan prácticamente a cualquier secuencia de ADN deseada y cuando se introducen a una célula, las TALEN se pueden usar para editar el ADN diana en la célula (por ejemplo, el genoma de la célula) mediante la inducción de cortes en la hebra doble. Para más información sobre el uso de TALEN, véase, por ejemplo: Hockemeyer y col. Nat Biotechnol. 2011 Jul 7;29(8):731-4; Wood y col. Science. 2011 Jul 15;333(6040):307; Tesson y col. Nat Biotechnol. 2011 Aug 5;29(8):695-6; y Huang y col., Nat Biotechnol. 2011 Aug 5;29(8):699-700; los cuales se incorporan a la presente a modo de referencia por sus descripciones relacionadas con las TALEN. El término "agente TALEN" abarca una TALEN y/o un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una TALEN.

[0084] El término "elemento de control" o "secuencia control" se refiere a una secuencia de nucleótidos involucrada en una interacción de moléculas que contribuye a la regulación funcional de un polinucleótido, que incluye replicación, duplicación, transcripción, corte y empalme, traducción, o degradación del nucleótido. La regulación puede afectar la frecuencia, velocidad, o especificidad del proceso, y puede ser de naturaleza potenciadora o inhibitoria. Los elementos de control conocidos en la materia incluyen, por ejemplo secuencias regulatorias de la transcripción tales como promotores y potenciadores. Un promotor es una región de ADN con capacidad bajo ciertas condiciones de unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una región codificante habitualmente localizada corriente abajo (en la dirección 3') del promotor. Los promotores pueden actuar de manera ubicua, es decir activos en muchos

tipos celulares, por ejemplo promotores CAG o CMV; o específicos de tejido o célula, por ejemplo el promotor rho, que se encuentra activo en los bastones, o el promotor opsina, se encuentra activo los conos.

[0085] El término "operativamente ligado" o "ligado de manera operativa" se refiere a una yuxtaposición de elementos genéticos en donde los elementos se encuentran en una relación que permite que operen de la manera esperada. Por ejemplo, un promotor se encuentra operativamente ligado a una región codificante si el promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificante. Pueden intervenir residuos entre el promotor y la región codificante con la condición de que esta relación funcional se mantenga.

[0086] El término "vector de expresión" abarca un vector que comprende una región de polinucleótido que codifica para un polipéptido de interés, y se usa para generar la expresión de la proteína en una célula diana deseada. Un vector de expresión también puede comprender elementos de control ligados operativamente a la región codificante para facilitar la expresión de la proteína en la diana. La combinación de elementos de control y un gen o genes a los cuales se encuentran operativamente ligados para la expresión algunas veces se los refiere como un "casete de expresión", muchos de los cuales son conocidos y se encuentran disponibles en la materia o pueden ser contruidos fácilmente a partir de componentes que se encuentran disponibles en la materia.

[0087] El término "hete" se refiere a derivado de una entidad diferente genotípicamente de aquella de la entidad con la cual 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 extraído de su secuencia codificante nativa y operativamente ligado a una secuencia codificante con la cual no se encuentra unida de manera natural es un promotor heterólogo. Por lo tanto, por ejemplo, un rAAV que incluye una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica para un producto génico heterólogo es un rAAV que incluye un polinucleótido que habitualmente no se encuentra en un AAV de tipo salvaje, de origen natural, y el producto génico heterólogo codificado es un producto génico no codificado habitualmente por un AAV de tipo salvaje de origen natural.

[0088] Los términos "alteración genética" y "modificación genética" (y las variantes gramaticales de los mismos), se usan como sinónimos en la presente para referirse a un proceso en donde un elemento genético (por ejemplo, un polinucleótido)

se introduce en una célula que no se encuentra en mitosis o meiosis. El elemento puede ser heterólogo para la célula, o puede ser una copia adicional o versión mejorada de un elemento ya presente en las células. La alteración genética se puede realizar, por ejemplo, por transfección de una célula con un plásmido recombinante u otro polinucleótido mediante un proceso conocido en la materia, tal como electroporación, precipitación con fosfato de calcio, o mediante el contacto con un complejo de polinucleótido-liposoma. La alteración genética también se puede realizar, por ejemplo, mediante la transducción o infección con un virus a ADN o ARN o vector viral. En general, el elemento genético se introduce en un cromosoma o minicromosoma en la célula; pero cualquier alteración que cambia el fenotipo y/o genotipo de la célula y su progenie se incluye dentro de este término.

[0089] Respecto a la modificación de la célula, el término "genéticamente modificado" o "transformado" o "transfectado" o "transducido" por ADN exógeno (por ejemplo mediante un virus recombinante) se refiere a cuando dicho ADN ha sido introducido en la célula. La presencia de ADN exógeno provoca un cambio genético permanente o transitorio. El ADN transformante puede o no ser integrado (ligado de manera covalente) en el genoma de la célula. Un "clon" es una población de células derivadas de una célula individual o ancestro común por mitosis. Una "línea celular" es un clon de una célula primaria que tiene la capacidad de crecer de manera estable *in vitro* por varias generaciones.

[0090] Como se usa en la presente, una célula se dice que está alterada, transdu y, modificada genéticamente, o transformada "de manera estable" con una secuencia genética si la secuencia se encuentra disponible para realizar su función durante el cultivo prolongado de la célula *in vitro* y/o durante un período prolongado de tiempo *in vivo*. En general, dicha célula está alterada (genéticamente modificada) "de manera heredable" cuando se introduce una alteración genética que también es heredable por la progenie de la célula alterada.

[0091] Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína" se usan como sinónimo en la presente para referirse a polímeros de los aminoácidos de cualquier longitud. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, lipidación, fosforilación, o conjugación con un componente de etiquetado. Los polipéptidos tales como polipéptidos antiangiogénicos, polipéptidos neuroprotectores, y similares, cuando se describen en el contexto de la provisión de un producto génico a un sujeto

mamífero, y composiciones de los mismos, se refieren al respectivo polipéptido intacto, o cualquier fragmento o derivado diseñado genéticamente de los mismos, que retienen la función bioquímica deseada de la proteína intacta. De manera similar, las referencias a los ácidos nucleicos que codifica para polipéptidos antiangiogénicos, ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos neuroprotectores, y otros de dichos ácidos nucleicos para usar en la provisión de un producto génico a un sujeto mamífero (que pueden ser referido como "transgenes" a ser administrados a una célula receptora), incluyen polinucleótidos que codifican para el polipéptido intacto o cualquier fragmento o derivado diseñado genéticamente que posea la función bioquímica deseada.

[0092] Como se usa en la presente, un plásmido "aislado", ácido nucleico, vector, virus, virión, célula huésped, proteína, u otra sustancia se refiere a una preparación de la sustancia desprovista de al menos algunos de los otros componentes que también pueden estar presentes cuando la sustancia o una sustancia similar existe de manera natural o que se prepara inicialmente a partir de la misma. Por lo tanto, por ejemplo, una sustancia aislada se puede preparar mediante el uso de una técnica de purificación para enriquecerla a partir de una mezcla de origen. El enriquecimiento se puede medir en términos absolutos, tal como peso por volumen de solución, o se puede medir en relación a una segunda sustancia potencialmente de interferencia presente en la mezcla de origen. El aumento en el enriquecimiento de las formas de realización de esta divulgación está cada vez más aislado. Un plásmido aislado, ácido nucleico, vector, virus, célula huésped, u otra sustancia está purificada en algunas formas de realización, por ejemplo, entre aproximadamente 80% y aproximadamente 90% de pureza, por lo menos aproximadamente 90% de pureza, por lo menos aproximadamente 95% de pureza, por lo menos aproximadamente 98% de pureza, o por lo menos aproximadamente 99%, o más, de pureza.

[0093] Como se usan en la presente, los términos "tratamiento", "tratando", y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir de manera completa o parcial una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. El "tratamiento", como se usa en la presente, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, en particular en un humano, e incluye: (a) prevenir que se presente la enfermedad (y/o síntomas provocados por la enfermedad) en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad o con riesgo de adquirir la enfermedad pero

que aún no ha sido diagnosticado como que la tiene; (b) inhibir la enfermedad (y/o síntomas provocados por la enfermedad), es decir, de tener su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad (y/o síntomas provocados por la enfermedad), es decir, provocar la regresión de la enfermedad (y/o síntomas provocados por la enfermedad), es decir, aliviar la enfermedad y/o uno o más síntomas de la enfermedad. Por ejemplo, las composiciones sujeto y métodos pueden estar dirigidos al tratamiento de una enfermedad retiniana. Los métodos no limitantes para evaluar las enfermedades retinianas y el tratamiento de las mismas incluyen medir funciones de la retina y cambios en las mismas, por ejemplo cambios en la agudeza visual (por ejemplo agudeza visual con la mejor corrección [BCVA], deambulación, navegación, detección de objetos y discriminación), cambios en el campo visual (por ejemplo perímetro de campo visual estático y cinético), examen clínico (por ejemplo examen con lámpara de rendija de los segmentos anterior y posterior del ojo), respuesta electrofisiológica a todas las longitudes de onda de luz y 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 para color, adaptación oscuridad y/o sensibilidad a los contrastes; medida de los cambios en la anatomía o salud utilizando medidas anatómicas y/o fotográficas, por ejemplo Tomografía de coherencia óptica (OCT), fotografía del fondo, oftalmoscopia láser de barrido óptico adaptativo, fluorescencia y/o autofluorescencia; medida de la movilidad ocular y movimiento de los ojos (por ejemplo nistagmo, preferencia de fijación, y estabilidad), medido de resultados informados (cambios informados por el paciente en los comportamientos y actividades guiadas visuales y no visuales, resultados informados por el paciente [PRO], evaluaciones basadas en cuestionarios de la calidad de vida, actividades diarias y medidas de la función neurológica (por ejemplo imágenes de resonancia magnética funcional (MRI)).

[0094] Los términos "individual", "huésped", "sujeto", y "paciente" se usan como sinónimos en la presente, y se refieren a un mamífero, que incluye, a título enunciativo no taxativo, humanos; primates no humanos, que incluye simios; animales mamíferos para deportes (por ejemplo, caballos); animales mamíferos para granja (por ejemplo, ovejas, cabras, etc.); mascotas mamíferas (perros, gatos, etc.); y roedores (por ejemplo, ratones, ratas, etc.).

[0095] En algunas formas de realización, el individuo es un humano que ha estado previamente expuesto de manera natural a AAV y como resultado presenta

anticuerpos anti-AAV (es decir, anticuerpos neutralizantes de AAV). En algunas formas de realización, el individuo es un humano que ha sido previamente administrado con un vector de AAV (y como resultado puede presentar anticuerpos anti-AAV) y requiere de la readministración del vector para el tratamiento de una condición diferente o para un tratamiento adicional de la misma condición. En base a los resultados positivos en ensayos clínicos que involucran la administración génica de AAV, por ejemplo, a hígado, músculo, y retina -todos tejidos afectados por los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra este vehículo- existen muchas de dichas aplicaciones terapéuticas/blancos de la enfermedad.

[0096] El término "cantidad eficaz" como se usa en la presente es una cantidad suficiente para generar resultados clínicos beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones. Para los propósitos de esta divulgación, una cantidad eficaz de un compuesto (por ejemplo, un virión de rAAV infeccioso) es una cantidad que es suficiente para apalear, aliviar, estabilizar, revertir, prevenir, enlentecer o retrasar la progresión de (y/o síntomas asociados con) un estado particular de enfermedad (por ejemplo, una enfermedad de la retina). En consecuencia, una cantidad de un virión de rAAV infeccioso es una cantidad del virión de rAAV infeccioso que tiene la capacidad de proveer de manera eficaz un ácido nucleico heterólogo a una célula diana (o células dianas) del individuo. Las cantidades eficaces se pueden determinar de manera preclínica, por ejemplo, mediante la detección del producto génico (ARN, proteína) en la célula o tejido que está codificado por la secuencia de ácido nucleico heterólogo utilizando técnicas que son bien conocidas en la materia, por ejemplo RT-PCR, transferencia western, ELISA, lecturas de fluorescencia u otros reporteros, y similares. Las cantidades eficaces se pueden determinar de manera clínica, por ejemplo, mediante la detección de un cambio en el inicio o progresión de la enfermedad utilizando métodos conocidos en la materia, por ejemplo autofluorescencia del fondo, angiografía con fluoresceína, OCT, microperimetría, óptica adaptativa, etc. y similares, como se describe en la presente y como se conoce en la materia.

[0097] El término "célula de la retina" se refiere en la presente a cualquiera de los tipos celulares que comprenden la retina, tal como, sin limitación, células ganglionares de la retina (RG), células amácrinas, células horizontales, células bipolares, células fotorreceptoras, células gliales de Müller, células de la microglia, y epitelio pigmentado de la retina (RPE). El término "células fotorreceptoras" se refiere

en la presente a, sin limitación, células bastones o “bastones” y células conos o “conos”. El término “células de Müller” o “gliales de Müller” se refiere a células gliales que dan soporte a las neuronas en la retina de vertebrados.

[0098] El término “evolución dirigida” se refiere a una metodología de diseño de la cápside, *in vitro* y/o *in vivo*, que emula la evolución natural mediante rondas iterativas de diversificación genética y procesos de selección, acumulando de esta manera mutaciones beneficiosas que mejoran de manera progresiva la función de una biomolécula. La evolución dirigida con frecuencia involucra un método *in vivo* referido como “*biopanning*” para la selección de variantes de AAV de una biblioteca cuyas variantes poseen un nivel más eficaz de infectividad de una célula o tejido tipo de interés.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0099] Los virus adenoasociados (AAV) son una familia de parvovirus con un genoma de ADN de hebra simple de 4,7 kb contenido dentro de una cápside sin envoltura. El genoma viral de un AAV de origen natural tiene 2 repeticiones terminales invertidas (ITR) – que funcionan como el origen de replicación viral y señal de empaquetamiento – flanqueando 2 marcos abiertos de lectura (ORF) principales: *rep* (que codifica para proteínas que funcionan en la replicación viral, regulación transcripcional, integración específica de sitio, y ensamblado del virión) y *cap*. El ORF *cap* codifica para 3 proteínas estructurales que se ensamblan para formar una cápside 60-mero viral. Se han aislado muchas variantes y serotipos de AAV de origen natural, y ninguna ha sido asociada con enfermedad humana.

[00100] Las versiones recombinantes de AAV se pueden usar como vectores de administración génica, en donde se inserta un gen marcador o terapéutico de interés entre las ITR en lugar de *rep* y *cap*. Se ha mostrado que estos vectores transducen células en división y que no se están dividiendo *in vitro* e *in vivo* y puede generar una expresión estable del transgén durante años en el tejido posmitótico. Véase por ejemplo, Knipe DM, Howley PM. *Fields’ Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA, 2007; Gao G-P, 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 cinomolgo 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.

[00101] El AAV recombinante (referido en la presente simplemente como “AAV”) ha generado resultados prometedores en una cantidad en aumento de ensayos clínicos. Sin embargo, existen impedimentos para la administración génica que puede limitar la utilidad de los AAV, tales como respuestas inmunológicas dirigidas contra la cápside, baja transducción de ciertos tejidos, una incapacidad para administrar de manera dirigida a tipos celulares específicos y una capacidad relativamente baja de transporte. En muchas situaciones, existe un conocimiento mecanístico insuficiente para fortalecer de manera eficaz el diseño racional con la capacidad de mejorar los AAV. Como alternativa, ha emergido la evolución dirigida como una estrategia para crear variantes de AAV novedosas que cumplan con los requerimientos biomédicos específicos. Las estrategias de evolución dirigida sacan provecho de la diversificación genética y de procesos de selección 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 salvaje se diversifican mediante diferentes estrategias para crear bibliotecas genéticas grandes que son empaquetadas para generar bibliotecas de partículas virales, y luego se aplica presión de selección para aislar variantes novedosas que puedan superar las barreras de administración génica. Importantemente, no se requiere conocer las bases mecanísticas que subyacen un problema de administración génica para la evolución dirigida de la función, que puede acelerar de esta manera el desarrollo de vectores mejorados.

[00102] Habitualmente, las variantes descritas en la presente se generaron mediante el uso de una biblioteca y/o bibliotecas de AAV. Dicha biblioteca o bibliotecas de AAV se genera/generan mediante la mutación del gen *cap*, el gen que

codifica para las proteínas estructurales de la cápside de AAV, mediante una variedad de técnicas de evolución dirigida conocidas y disponibles fácilmente para las personas con experiencia en el campo del diseño del genoma viral. Véase por ejemplo, Bartel y col. *Am. Soc. Gene Cell Ther.* 15th Annu. Meet. 20, S140 (2012); Bowles, D. y col. *J. Virol.* 77, 423-432 (2003); Gray y col. *Mol. Ther.* 18, 570-578 (2010); Grimm, D. y col. *J. Virol.* 82, 5887-5911; Koerber, J. T. y col. *Mol. Ther.* 16, 1703-1709 (2008); Li W. y col. *Mol. Ther.* 16, 1252-1260 (2008); Koerber, J. T. y col. *Methods Mol. Biol.* 434, 161-170 (2008); Koerber, J. T. y col. *Hum. Gene Ther.* 18, 367-378 (2007); y Koerber, J. T. y col. *Mol. Ther.* 17, 2088-2095 (2009). Dichas técnicas, sin limitación, con como a continuación: i) PCR propensa a error para introducir mutaciones puntuales al azar en el marco de lectura abierto (ORF) *cap* de AAV a una tasa predeterminada, que se puede modificar; ii) Recombinación viral *in vitro* o *in vivo* o “mezclado de ADN” para generar quimeras al azar de genes *cap* de AAV para obtener una biblioteca de genes con múltiples serotipos de AAV; iii) Inserciones de péptidos al azar en sitios definidos de la cápside mediante ligado de oligonucleótidos degenerados en el ORF *de cap*; iv) Inserciones definidas de secuencias que codifican para péptidos en ubicaciones al azar del ORF de *cap* de AAV usando mutagénesis por transposones; v) Reemplazo de bucles de superficie de las cápsides de AAV con bibliotecas de secuencias de péptidos diseñados de manera bioinformática en base al nivel de conservación de cada posición de aminoácido entre serotipos y variantes de AAV natural para generar bibliotecas “intercambio de bucles”; vi) Sustitución al azar de aminoácidos en las posiciones de degeneración entre serotipos de AAV para generar bibliotecas de variantes ancestrales (Santiago-Ortiz y col., 2015); y una combinación de dichas técnicas.

[00103] El mezclado de ADN genera quimeras que combinan sus propiedades parentales de manera única, y con frecuencia beneficiosa; sin embargo, algunas pueden ser incapaces de empaquetarse que, en efecto, reduce la diversidad de la biblioteca. La concentración de la diversidad de la biblioteca se logra mediante técnicas de inserción peptídica tales como, sin limitación, iii-iv) precedentes. La diversidad de la biblioteca también se concentra en técnicas tales como la v) precedente, y dicha concentración está dirigida a múltiples regiones hipervariables, que subyacen en los bucles expuestos en la superficie, de la cápside de AAV. Si bien muchas de las técnicas generan cápsides variantes con solo una pequeña área de la cápside mutada,

estas técnicas se pueden aparear con estrategias de mutagénesis adicional para modificar la cápside completa.

[00104] Una vez que se genera la biblioteca o las bibliotecas de AAV, luego se empaquetan los virus, de manera que cada partícula de AAV comprenda una cápside mutante alrededor de un gen *cap* que codifica para la cápside, y se purifica. Las variantes de la biblioteca se someten luego a técnicas de presión de selección *in vitro* y/o *in vivo* conocidas y disponibles fácilmente para las personas con experiencia en el campo de los AAV. Véase por ejemplo, Maheshri, N. y col. *Nature Biotech.* 24, 198-204 (2006); Dalkara, D. y col. *Sci. Transl. Med.* 5, 189ra76 (2013); Lisowski, L. y col. *Nature.* 506, 382-286 (2013); Yang, L. y col. *PNAS.* 106, 3946-3951 (2009); Gao, G. y col. *Mol. Ther.* 13, 77-87 (2006); y Bell, P. y col. *Hum. Gene. Ther.* 22, 985-997 (2011). Por ejemplo, sin limitación, las variantes de AAV se pueden seleccionar utilizando i) columnas de afinidad en las cuales la elusión de las diferentes fracciones genera variantes con propiedades de unión alteradas; ii) células primarias – aisladas de muestras de tejido o líneas celulares inmortales que mimetizan el comportamiento de células en el cuerpo humano – que genera variantes de AAV con eficacia y/o especificidad de tejido aumentada; iii) modelos animales – que mimetizan un entorno de terapia génica clínica – que genera variantes de AAV que han infectado de manera exitosa a tejido diana; iv) modelos de xenoinjerto de humano que generan variantes de AAV que han infectado a células de humano con injerto infectadas; y/o una combinación de técnicas de selección de las mismas.

[00105] Una vez que se han seleccionado los virus, los mismos pueden ser recuperados mediante técnicas conocidas tales como, sin limitación, replicación mediada por adenovirus, amplificación por PCR, secuenciación de alto rendimiento y clonado, y similares. Los clones de virus se enriquecen luego mediante rondas repetidas de las técnicas de selección y se aísla el ADN del AAV para recuperar los genes *cap* variantes seleccionados de interés. Dichas variantes seleccionadas se pueden someter a modificación o mutación adicional y así servir como un nuevo punto de partida para los pasos de selección posteriores para aumentar de manera iterativa la aptitud del virus AAV. Sin embargo, en ciertos casos, se han generado cápsides exitosas sin mutación adicional.

[00106] Las variantes de AAV descritas en la presente se generaron por lo menos en parte mediante el uso de metodología de evolución dirigida *in vivo*, tal como mediante las técnicas descritas precedentemente, que involucran el uso de cribado con

retinas de primate después de la administración intravítrea. De esta manera, las cápsides variantes de AAV descritas en la presente comprenden una o más modificaciones en la secuencia de aminoácidos que les confieren una transducción más eficaz de células de la retina de primate que una proteína de la cápside de AAV parental correspondiente. Como se usa en la presente, una “proteína de la cápside de AAV parental correspondiente” se refiere a una proteína de la cápside de AAV del mismo serotipo de AAV de tipo salvaje o variante que la proteína variante de la cápside de AAV sujeto pero que no comprende la una o más modificaciones en la secuencia de aminoácidos que la proteína variante de la cápside de AAV sujeto.

[00107] En algunas formas de realización, la proteína variante de la cápside de AAV sujeto comprende un péptido heterólogo de entre aproximadamente 5 aminoácidos y aproximadamente 20 aminoácidos insertado mediante unión covalente en un bucle GH de la proteína de la cápside de AAV, o bucle IV, en relación a la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental. El “bucle GH”, o bucle IV, de la proteína de la cápside de AAV se refiere a la parte accesible por el solvente referido en la materia como el bucle GH, o bucle IV, de proteína de la cápside de AAV. Para el bucle GH/bucle IV de la cápside de AAV, véase, por ejemplo, van Vliet y col. (2006) *Mol. Ther.* 14:809; Padron y col. (2005) *J. Virol.* 79:5047; y Shen y col. (2007) *Mol. Ther.* 15:1955. Por lo tanto, por ejemplo, el sitio de inserción se puede encontrar aproximadamente entre los aminoácidos 411-650 de una proteína de la cápside VP1 de AAV. Por ejemplo, el sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 571-612 de VP1 de AAV1, aminoácidos 570-611 de VP1 de AAV2, entre los aminoácidos 571-612 de VP1 de AAV3A, entre los aminoácidos 571-612 de VP1 de AAV3B, entre los aminoácidos 569-610 de VP1 de AAV4, entre los aminoácidos 560-601 de VP1 de AAV5, entre los aminoácidos 571 y 612 de VP1 de AAV6, entre los aminoácidos 572 y 613 de VP1 de AAV7, entre los aminoácidos 573 y 614 de VP1 de AAV8, entre los aminoácidos 571 y 612 de VP1 de AAV9, o entre los aminoácidos 573 y 614 de VP1 de AAV10, o los correspondientes aminoácidos de cualquier variante de las mismas. Aquellos con experiencia en la materia sabrán, en base a una comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cápside de diferentes serotipos de AAV, cuando un sitio de inserción “que se corresponde a los aminoácidos de AAV2” podría estar en una proteína de la cápside de cualquier serotipo de AAV dado. Véase también en la **Figura 6** un alineamiento de las SEQ ID NOS:1-11 de AAV de tipo

salvaje que proveen las ubicaciones de aminoácidos dentro y a lo largo de los serotipos AAV1, AAV2, AAV3A, AAV3B, y AAV4-10 de tipo salvaje (de origen natural).

[00108] En determinadas formas de realización, el sitio de inserción es un sitio de inserción individual entre dos aminoácidos adyacentes ubicados entre los aminoácidos 570-614 de VP1 de cualquier serotipo de AAV de tipo salvaje o variante de AAV, por ejemplo, el sitio de inserción se encuentra entre dos aminoácidos adyacentes ubicados en 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, aminoácidos 581 y 582, aminoácidos 583 y 584, aminoácidos 584 y 585, aminoácidos 585 y 586, aminoácidos 586 y 587, 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, aminoácidos 576 y 577, aminoácidos 577 y 578, aminoácidos 578 y 579, o aminoácidos 579 y 580. El sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 590 y 591, aminoácidos 591 y 592, aminoácidos 592 y 593, aminoácidos 593 y 594, aminoácidos 594 y 595, aminoácidos 595 y 596, aminoácidos 596 y 597, 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.

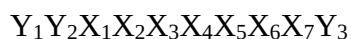
[00109] En algunas formas de realización, una inserción peptídica descrita en la presente tiene una longitud de 5 aminoácidos, 6 aminoácidos, 7 aminoácidos, 8 aminoácidos, 9 aminoácidos, 10 aminoácidos, 11 aminoácidos, 12 aminoácidos, 13 aminoácidos, 14 aminoácidos, 15 aminoácidos, 16 aminoácidos, 17 aminoácidos, 18 aminoácidos, 19 aminoácidos, o 20 aminoácidos. En otra forma de realización, una inserción peptídica descrita en la presente comprende entre 1 y 4 aminoácidos espaciadores en el extremo amino (extremo N terminal) y/o en el extremo carboxilo (extremo C terminal) de una cualquiera de las inserciones peptídicas descritas en la presente. Los aminoácidos espaciadores ejemplificativos incluyen, sin limitación, leucina (L), alanina (A), glicina (G), serina (S), treonina (T), y prolina (P). En

determinadas formas de realización, una inserción peptídica comprende 2 aminoácidos espaciadores en el extremo N terminal y 2 aminoácidos espaciadores en el extremo C terminal. En otras formas de realización, una inserción peptídica comprende 2 aminoácidos espaciadores en el extremo N terminal y 1 aminoácidos espaciadores en el extremo C terminal.

[00110] Las inserciones de péptidos descritas en la presente no han sido descritas y/o insertadas previamente en una cápside de AAV. Sin desear de estar ligado a una teoría, la presencia de cualquiera de las inserciones de péptido descritas puede actuar disminuyendo la afinidad de la cápside variante a heparin sulfato que reduce posiblemente la unión a la matriz extracelular en la parte frontal de la retina de primates. Además, los motivos de inserción de péptido descritos en la presente pueden conferir una transducción mejorada de células de la retina de primate mediante la adición de un dominio de unión a receptor de la superficie de la célula.

[00111] En algunas formas de realización preferidas, el péptido de inserción comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las fórmulas siguientes.

[00112] En algunos aspectos, un péptido de inserción puede ser un péptido de 7 a 10 aminoácidos de longitud, de Fórmula 1a:



En donde cada uno de Y_1 - Y_3 , si está presente, se selecciona de manera independiente 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

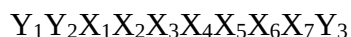
X_5 se selecciona de Thr, Lys y Asn

X_6 se selecciona de Lys, Asn y Glu

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

[00113] En determinadas formas de realización, el péptido de inserción de Fórmula 1a comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre 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).

[00114] En otros aspectos, un péptido de inserción puede ser un péptido de 7 a 10 aminoácidos de longitud, de Fórmula 1b:



En donde cada uno de Y_1 - Y_3 , si está presente, se selecciona de manera independiente 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 e 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

[00115] En determinadas formas de realización, el péptido de inserción de Fórmula 1b comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre 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).

[00116] En otros aspectos, un péptido de inserción puede ser un péptido de 7 a 10 aminoácidos de longitud, de Fórmula 1c



En donde cada uno de Y_1 - Y_3 , si está presente, se selecciona de manera independiente 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

[00117] En determinadas formas de realización, el péptido de inserción de Fórmula 1c comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre QADTTKN (SEQ ID NO:13), ISDQTKH (SEQ ID NO:14), NQDYTKT (SEQ NO:16), y HQDTTKN (SEQ ID NO:19).

[00118] En otros aspectos, un péptido de inserción puede ser un péptido de 7 a 10 aminoácidos de longitud, de Fórmula 1d:



En donde cada uno de Y_1 - Y_3 , si está presente, se selecciona de manera independiente de Ala, Leu, Gly, Ser, Thr, Pro

X₁ se selecciona de Gln e Ile

X₂ se selecciona de Ala y Ser

X₃ se selecciona de Thr y Gln

X₄ se selecciona de Asn y His

[00119] En determinadas formas de realización, el péptido de inserción de Fórmula 1d comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre QADTTKN (SEQ ID NO:13) e ISDQTKH (SEQ ID NO:14).

[00120] En otros aspectos, un péptido de inserción puede ser un péptido de 7 a 11 aminoácidos de longitud, de Fórmula 1e

Y₁Y₂X₁X₂AsnX₃AsnGluX₄Y₃

En donde cada uno de Y₁-Y₃, si está presente, se selecciona de manera independiente de Ala, Leu, Gly, Ser, Thr, Pro

X₁ se selecciona de Gln e Ile

X₂ se selecciona de Ala y Ser

X₃ se selecciona de Glu y Ala

X₄ se selecciona de Asn y His

[00121] En otras formas de realización, un péptido de inserción de Fórmula 1e comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre ISNENEH (SEQ ID NO:21), y QANANEN (SEQ ID NO:22).

[00122] En aún otra forma de realización, un péptido de inserción puede ser un péptido de 7 a 11 aminoácidos de longitud, de Fórmula IIa:

Y₁Y₂X₁X₂DX₃TKX₄Y₃.

En donde cada uno de Y₁-Y₃, si está presente, se selecciona de manera independiente de Ala, Leu, Gly, Ser, Thr, Pro

X₁ se selecciona de Q, N, A, H, e I;

X₂ se selecciona de Q, A, P, y S;

X₃ se selecciona de T, Y, S, y Q; y

X₄ se selecciona de T, N, A, y H.

[00123] En otra forma de realización de una inserción peptídica de una secuencia de aminoácidos de fórmula X₁X₂DX₃TKX₄, 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).

[00124] En algunas de dichas formas de realización, un péptido de inserción puede ser un péptido de 7 a 11 aminoácidos de longitud, de Fórmula IIb:



[00125] En donde cada uno de Y_1 - Y_3 , si está presente, se selecciona de manera independiente 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.

[00126] En otra forma de realización 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).

[00127] En otras formas de realización, el péptido de inserción comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre KDRAPST (SEQ ID NO:26), TNRTSPD (SEQ ID NO:24), PNSTHGS (SEQ ID NO:25) y GKSKVID (SEQ ID NO:23).

[00128] En algunas formas de realización, el péptido de inserción comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre 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).

[00129] En otras formas de realización preferidas, el péptido de inserción tiene entre 1 y 3 aminoácidos espaciadores (Y_1 - Y_3) en el extremo amino y/o carboxilo terminal de una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre 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), LAHPDITTKNA (SEQ ID NO:33), LAHQDITTKNA (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).

[00130] En algunas formas de realización, la proteína variante de la cápside de AAV sujeto no incluye ninguna otra modificación de secuencia de aminoácidos diferente de una inserción peptídica de entre aproximadamente 5 aminoácidos y aproximadamente 20 aminoácidos en el bucle GH, o bucle IV. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la proteína variante de la cápside de AAV sujeto comprende una inserción peptídica que comprende una secuencia de aminoácidos 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), HPDITTKN (SEQ ID NO:18), HQDITTKN (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), LAQADITTKNA (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), LAHPDITTKNA (SEQ ID NO:33), LAHQDITTKNA (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 variante de la cápside de AAV comprende dicha inserción y, por lo demás, es idéntica a la correspondiente proteína de la cápside de AAV). En otras palabras, la proteína variante de la cápside de AAV que comprende dicha inserción es idéntica de otra manera a la proteína de la cápside de AAV parental en la cual se ha insertado el péptido. Como ejemplo adicional, la proteína variante de la cápside de AAV sujeto comprende una inserción peptídica que tiene una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre 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), HPDITTKN (SEQ ID NO:18), HQDITTKN (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 donde la inserción peptídica está localizada entre los aminoácidos 587 y 588 de la VP1 de la cápside de AAV2 o los correspondientes aminoácidos 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 secuencia de la proteína variante de la cápside de AAV es idéntica de otra manera a la correspondiente secuencia de la proteína de la cápside de AAV parental, por ejemplo una cualquiera de las SEQ ID NOs:1-12.

[00131] En otras formas de realización, la proteína variante de la cápside de AAV sujeto, además de comprender una inserción de péptido, por ejemplo como se describe en la presente o como se conoce en la materia, en el bucle GH, comprende entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 sustituciones o eliminaciones de aminoácido, por ejemplo entre 1 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 4, entre aproximadamente 2 y aproximadamente 5, entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 15, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 20, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 25, entre aproximadamente 25-50, entre aproximadamente 50-100 sustituciones o eliminaciones de aminoácido en comparación con la proteína de la cápside de AAV parental. Por lo tanto, en algunas formas de realización, una proteína variante de la cápside sujeto 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 de AAV parental, por ejemplo una proteína de la cápside de tipo salvaje como se describe en la SEQ ID NOs:1-12.

[00132] En otra forma de realización, la una o más sustituciones de aminoácido se encuentran en el o 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 proteína de la cápside VP1 de AAV2 según la numeración previa a la inserción del péptido, o el o los correspondientes residuos de aminoácido de otra proteína de la cápside de AAV. En algunas de dichas formas de realización, la una o más sustituciones de aminoácido 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 proteína de la cápside VP1 de AAV2 según la numeración previa a la inserción del péptido, o el o los correspondientes aminoácidos de otra proteína de la cápside de AAV.

[00133] En una forma de realización preferida, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 que se selecciona entre 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 diferente de AAV2), en donde el o los aminoácidos sustituidos no existen naturalmente en las correspondientes posiciones: 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 las mismas. En algunas formas de realización, la una o más sustituciones de aminoácido 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 la inserción peptídica está ubicado entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV.

[00134] 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, que consiste esencialmente, o que 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 correspondientes aminoácidos de otra cápside de AAV, y además comprende una sustitución de aminoácido P34A en el residuo 34 en relación a la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o el correspondiente residuo de otra cápside de AAV. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2 o la correspondiente cápside de AAV parental. En una forma de realización particularmente preferida, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKAAERHKDDSRGLVLPGYK
YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQ
ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT
GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR
PKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA
GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTN
PVATEQYGSVSTNLQRGNLAISDQTKHARQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
DVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSA
AKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDT
NGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:42)

[00135] 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, que consiste esencialmente, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) o LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29) entre los aminoácidos 587 y 588 de AAV2 proteína de la cápside o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV y comprende una sustitución de aminoácido N312K en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental y opcionalmente además comprende 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 correspondientes sustituciones 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 que comprende, que consiste esencialmente, o que 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 correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV y comprende las 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 correspondientes residuos en otro serotipo de AAV parental. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o mayor, identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe 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 por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
 YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQ
 ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
 DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT

GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
 LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR
 PKRLKFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
 CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
 YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTDTPSGTTTQSRLQFSQA
 GASDIRNQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
 VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTSVDIEKVMITDEEEIRTTNP
 VATEQYGSVSTNLQRGNLAISDQTKHARQAATADVNTQGVLPGMVWQDRD
 VYLQGPWIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSA
 KFAFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEVQYTSNYNKSVNVDFTVDT
 NGVYSEPRPIGTRYLTRNQ (SEQ ID NO:43)

[00136] En otra forma de realización, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 y 591 de AAV8 o AAV10, la inserción peptídica que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre ISDQTKH (SEQ ID NO:14), LGISDQTKHA (SEQ ID NO:29) y LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28), y b) una sustitución valina a isoleucina en el aminoácido 709 de AAV3A o AAV3B, una sustitución alanina a isoleucina en la posición 709 de AAV1 o AAV6, una sustitución asparagina a isoleucina en el aminoácido 707 de AAV4 o aminoácido 709 de AAV9 o una sustitución treonina a isoleucina en el aminoácido 710 de AAV7 o aminoácido 711 de AAV8 o AAV10 o una sustitución glutamina a isoleucina en el aminoácido 697 de AAV5 y es opcionalmente idéntica de otra manera a una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 y 3-12. En formas de realización preferidas, la proteína variante de la cápside comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos ISDQTKH (SEQ ID NO:14) o que comprende, que consiste esencialmente, o que 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 aminoácido valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2, en donde la proteína variante de la cápside comprende entre 2 y 5, entre 5 y 10, o entre 10 y 15 sustituciones de aminoácidos.

[00137] En aún otra forma de realización, la proteína variante de la cápside comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos ISDQTKH (SEQ ID NO:14) o que comprende, que consiste esencialmente, o que 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 valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

[00138] En aún otra forma de realización, la proteína variante de la cápside comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos ISDQTKH (SEQ ID NO:14) o que comprende, que consiste esencialmente, o que 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, 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 por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQ
ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDGADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT
GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR
PKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA
GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTN
PVATEQYGSVSTNLQRGNLGISDQTKHARQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
DVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSA
AKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDT
NGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:44)

[00139] En una forma de realización preferida, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 que se selecciona entre 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 diferente de AAV2), en donde el o los aminoácidos sustituidos no existen de manera natural en las correspondientes posiciones: 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 las mismas, preferiblemente seleccionadas de S109T, P250S, A524T, A593E, I698V, V708I, y/o V719M. El sitio de inserción peptídica preferiblemente se ubica entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la correspondiente posición 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 correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV y comprende una sustitución de aminoácidos I698V en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental, en donde el o los aminoácidos sustituidos no existen de manera natural en la correspondiente posición. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o mayor, identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la correspondiente sustitución de aminoácidos 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 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 por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQ
ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT
GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR
PKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA
GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTN
PVATEQYGSVSTNLQRGNLAQADTTKNARQAATADVNTQGVLPGMVWQD
RDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFS
AAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEVQYTSNYNKSvNVDFTV
DTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:45)

[00140] 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 correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV y comprende una sustitución V719M de aminoácido y opcionalmente una sustitución V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental, en donde el o los aminoácidos sustituidos no existen de manera natural en la correspondiente posición.

[00141] En otra forma de realización, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 y 591 de AAV8 o AAV10, la inserción peptídica que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre QADTTKN (SEQ ID NO:13) y LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27), y b) una sustitución valina a isoleucina en el aminoácido 709 de AAV3A o AAV3B, una sustitución alanina a isoleucina en la posición 709 de AAV1 o AAV6, una sustitución asparagina a isoleucina en el aminoácido 707 de AAV4 o aminoácido 709 de AAV9 o una sustitución treonina a isoleucina en el aminoácido 710 de AAV7 o aminoácido 711 de AAV8 o AAV10 o una sustitución glutamina a isoleucina en el aminoácido 697 de AAV5. En otra forma de realización, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 y 591 de AAV8 o AAV10, la inserción peptídica que comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre QADTTKN (SEQ ID NO:13) y LAQADTTKNA (SEQ ID NO:27), y b) una sustitución de aminoácidos 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 serina a treonina en el aminoácido 109 (S109T) o una sustitución de aminoácidos valina a isoleucina en el aminoácido 708 (V708I) en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2, en donde la proteína variante de la cápside comprende entre 1 y 5, entre 5 y 10, o entre 10 y 15 sustituciones de aminoácidos y preferiblemente tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe 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 correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV y comprende una sustitución serina a treonina en el aminoácido 109 y una sustitución de aminoácidos valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2.

[00142] En aún otra forma de realización, la proteína variante de la cápside 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) por lo menos una sustitución de aminoácido, en donde la secuencia de aminoácidos de la cápside variante no comprende una sustitución de aminoácidos valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y no comprende una sustitución de serina a treonina en el aminoácido 109 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2.

[00143] En aún otra forma de realización, la proteína variante de la cápside 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, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

[00144] En otra forma de realización preferida, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 que se selecciona entre 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 el o los aminoácidos sustituidos no existen de manera natural en las correspondientes posiciones: 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 las mismas. En algunas formas de realización, la proteína de la cápside de AAV comprende una o más sustituciones de

aminoácido seleccionadas entre S109T, R389S, A593E y/o V708I. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica se localiza entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la correspondiente posición 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 S109T en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2.

[00145] En aún otra forma de realización, 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, 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 que se describe en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
 YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQ
 ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
 DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT
 GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
 LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR
 PKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
 CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
 YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA

GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTN
PVATEQYGSVSTNLQRGNLAHDITKNIARQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
DVYLGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSA
AKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDT
NGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:46)

[00146] En otras formas de realización, la cápside variante comprende a) una inserción peptídica que comprende, que consiste esencialmente, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAHDITKNIA entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y b) por lo menos una sustitución de aminoácido, en donde la secuencia de aminoácidos de la cápside variante no comprende una sustitución de aminoácidos valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2. En aún 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 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 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, 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 aminoácidos valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2.

[00147] En otra forma de realización preferida, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 que se selecciona entre 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 correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2), en donde el o los aminoácidos sustituidos no existen de manera natural en las correspondientes posiciones: 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 las mismas. En algunas formas de realización, la proteína de la cápside de AAV comprende una o más sustituciones de aminoácido seleccionadas entre S109T, S109T+S463Y, D368H y V708I. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica se localiza entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la correspondiente posición 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 V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2. En aún 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, 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, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
 YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAQEFQ
 ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTPGKKRPVEHSPVEP
 DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT
 GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH

LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR
 PKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
 CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
 YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA
 GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
 VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTN
 PVATEQYGSVSTNLQRGNLANQDYTKTAARQAATADVNTQGVLPGMVWQD
 RDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFS
 AAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTV
 DTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:47)

[00148] 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, 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 b) una sustitución de aminoácidos S109T en comparación con la secuencia de la SEQ ID NO:2 y opcionalmente una sustitución de aminoácidos S463Y, en donde la cápside variante es por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2. En algunas 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, 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 S109T en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

[00149] En otra forma de realización, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 y 591 de AAV8 o AAV10, en donde la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre NQDYTKT (SEQ ID NO:16) y LANQDYTKTA (SEQ ID NO:31), y b) una sustitución de aminoácidos 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 serina a lisina en la posición 312 de AAV3A o AAV3B o en la posición 315 de AAV8 o AAV10, o una sustitución 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, 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 b) una sustitución de aminoácidos N312K, en donde la proteína variante de la cápside comprende entre 1 y 5, entre 5 y 10, o entre 10 y 15 sustituciones de aminoácidos.

[00150] En otra forma de realización, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 que se selecciona entre 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 el o los aminoácidos sustituidos no existen de manera natural en las correspondientes posiciones: 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 las mismas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica se localiza entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la correspondiente posición 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 V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o más de identidad de

secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2. En aún otra forma de realización, 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, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAPNSTHGS (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 que se describe en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
 YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQ
 ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
 DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT
 GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
 LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR
 PKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
 CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
 YTFEDVPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA
 GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
 VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTN
 PVATEQYGSVSTNLQRGNLAPNSTHGSARQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
 DVYLQGPWIWAKIPHTDGHFHPSPMLMGFGFLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSA
 AKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDT
 NGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ IDNO:48)

[00151] En otra forma de realización, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 que se selecciona entre NKT TNKDA (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 el o los aminoácidos sustituidos no existen de manera natural en las correspondientes

posiciones: 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 las mismas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica se localiza entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la correspondiente posición 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 aminoácidos N449D en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2. En aún 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 que consiste en la secuencia de aminoácidos LANKTTNKDA (SEQ ID NO:35) entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
 YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQ
 ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
 DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT
 GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
 LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR
 PKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG

CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
 YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA
 GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
 VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTN
 PVATEQYGSVSTNLQRGNLANKTTNKDARQAATADVNTQGVLPGMVWQD
 RDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFS
 AAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTV
 DTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:49)

[00152] En otra forma de realización, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 que se selecciona entre 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 correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2), en donde el o los aminoácidos sustituidos no existen de manera natural en las correspondientes posiciones: 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 las mismas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica se localiza entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. En una forma de realización relacionada, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 y 591 de AAV8 o AAV10, en donde la inserción peptídica comprende una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre TNRTSPD (SEQ ID NO:24) y LATNRTSPDA (SEQ ID NO:39), y b) una sustitución valina a isoleucina en el aminoácido 709 de AAV3A o AAV3B, una sustitución alanina a isoleucina en la posición 709 de AAV1 o AAV6, una sustitución asparagina a isoleucina en el aminoácido 707 de AAV4 o aminoácido 709 de AAV9 o una sustitución treonina a isoleucina en el aminoácido 710 de AAV7 o aminoácido 711 de AAV8 o AAV10 o una sustitución glutamina a isoleucina en el aminoácido 697 de

AAV5. En otras formas de realización, la proteína variante de la cápside comprende a) una inserción peptídica que comprende, que consiste esencialmente, 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 aminoácidos valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2, en donde la proteína variante de la cápside comprende entre 1 y 5, entre 5 y 10, o entre 10 y 15 sustituciones de aminoácidos. En aún otra forma de realización, la proteína variante de la cápside 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 valina a isoleucina en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2.

[00153] En aún otra forma de realización, la proteína variante de la cápside comprende a) una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos TNRTSPD (SEQ ID NO:24) o que comprende, que consiste esencialmente, 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 por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
 YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQ
 ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
 DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT
 GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
 LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR
 PKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
 CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
 YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA

GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEEIRTTN
PVATEQYGSVSTNLQRGN**LATNRTSPDAR**QAATADVNTQGVLPGMVWQDR
DVYLGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSA
AKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDT
NGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:50)

[00154] En otra forma de realización, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 que se selecciona entre 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 el o los aminoácidos sustituidos no existen de manera natural en las correspondientes posiciones: 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 las mismas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica se localiza entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe 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, que consiste esencialmente, o que 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, 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 por lo menos una sustitución de aminoácido.

[00155] En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQ
ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT
GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR
PKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA
GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTN
PVATEQYGSVSTNLQRGN**LAGKSKVIDA**RQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
DVYLQGPWIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSA
AKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDT
NGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:51)

[00156] En otra forma de realización, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 que se selecciona entre 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 correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2), en donde el o los aminoácidos sustituidos no existen de manera natural en las correspondientes posiciones: 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 las mismas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica se localiza entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la correspondiente posición en la proteína de la cápside

de otro serotipo de AAV. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2. En aún otra forma de realización, la cápside variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos ASDSTKA (SEQ ID NO:15) o que comprende, que consiste esencialmente, 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 que se describe en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
 YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQ
 ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
 DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT
 GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
 LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR
 PKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
 CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
 YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA
 GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
 VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTN
 PVATEQYGSVSTNLQRGNLAASDSTKAARQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
 DVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSA
 AKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDT
 NGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:52)

[00157] En otra forma de realización, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 que se selecciona entre 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 correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2), en donde el o los aminoácidos sustituidos no existen de manera natural en las correspondientes posiciones: 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 las mismas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica se localiza entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2. En aún otra forma de realización, la cápside variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos KDRAPST (SEQ ID NO:26) o que comprende, que consiste esencialmente, o que consiste en la secuencia de aminoácidos LAKDRAPSTA (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 que se describe en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
 YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQ
 ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
 DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT
 GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
 LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR
 PKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
 CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
 YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA

GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
 VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEEIRTTN
 PVATEQYGSVSTNLQRGN**LAKDRAPSTAR**QAATADVNTQGVLPGMVWQDR
 DVYLGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSA
 AKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDT
 NGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:53)

[00158] En otra forma de realización, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 que se selecciona entre 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 correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2), en donde el o los aminoácidos sustituidos no existen naturalmente en una o más de las correspondientes posiciones: 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 las mismas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica se localiza entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2. En aún otra forma de realización, la cápside variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos HQDTTKN (SEQ ID NO:19) o que comprende, que consiste esencialmente, 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 que se describe en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad

de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQ
ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT
GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWDWQRLINNNWGFR
PKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA
GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTN
PVATEQYGSVSTNLQRGNLAHQDTTKNARQAATADVNTQGVLPGMVWQD
RDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFS
AAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTV
DTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:54)

[00159] En otra forma de realización, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 que se selecciona entre 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 correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2), en donde el o los aminoácidos sustituidos no existen naturalmente en una o más de las correspondientes posiciones: 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 las mismas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica se localiza entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o más de identidad de

secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2. En aún otra forma de realización, la cápside variante comprende una inserción peptídica que comprende la secuencia de aminoácidos ISNENEH (SEQ ID NO:21) o que comprende, que consiste esencialmente, 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 que se describe en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
 YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQ
 ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
 DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT
 GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
 LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR
 PKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
 CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
 YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA
 GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
 VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTN
 PVATEQYGSVSTNLQRGNLPISNENEHARQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
 DVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSA
 AKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDT
 NGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:55)

[00160] En otra forma de realización, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 que se selecciona entre 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 correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2), en donde el

o los aminoácidos sustituidos no existen de manera natural en las correspondientes posiciones: 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 las mismas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica se localiza entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2. En aún otra forma de realización, 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 que se describe en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYK
 YLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQ
 ERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEP
 DSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMAT
 GSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNH
 LYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFR
 PKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
 CLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFS
 YTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQA
 GASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
 VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTN
 PVATEQYGSVSTNLQRGNLPQANANENARQAATADVNTQGVLPGMVWQD

RDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFS
AAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTV
DTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:56)

[00161] En otra forma de realización, se provee una proteína variante de la cápside de AAV 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 que se selecciona entre 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 correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2), en donde el o los aminoácidos sustituidos no existen de manera natural en las correspondientes posiciones: 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 las mismas. Preferiblemente, el sitio de inserción peptídica se localiza entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de AAV2 o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. La cápside de AAV variante puede tener por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2. En aún otra forma de realización, 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 que se describe en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización, la cápside de AAV variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia con la siguiente secuencia de aminoácidos, o bien es 100% idéntica a la misma:

[00162] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKD
DSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYL

KYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGK
 KRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPPAA
 PSGLGTTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTST
 RTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRD
 WQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSE
 YQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFP
 SQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPS
 GTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTG
 ATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEK
 VMITDEEEIRTTPVATEQYGSVSTNLQRGN**LAHPDTTKNARQA**ATADVNT
 QGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIK
 NTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSN
 YNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:57).

[00163] En varios aspectos, se provee una proteína variante de la cápside de AAV que comprende una o más sustituciones de aminoácido relacionadas con la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental, en donde la proteína variante de la cápside, cuando está presente en un virión de AAV, confiere infectividad aumentada de una célula de la retina en comparación con la infectividad de una célula de la retina por parte de un virión de AAV que comprende la correspondiente proteína de la cápside del AAV parental.

[00164] En algunas formas de realización, una proteína variante de la cápside de AAV comprende una sustitución de aminoácidos P34A en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 (SEQ ID NO:2) o una sustitución de aminoácidos 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 variante de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2 o 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 variante de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución de

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

[00165] En otras formas de realización una proteína variante de la cápside de AAV 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) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2), en donde el aminoácido sustituido no existe de forma natural en la correspondiente posición. En algunas formas de realización preferidas, la proteína variante de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe 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 de aminoácidos glutamina a lisina en el aminoácido 164 en comparación con 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 serina a lisina en el aminoácido 160 de AAV5 o comprende una sustitución alanina a lisina en el aminoácido 164 de AAV9. En algunas formas de realización relacionadas, la proteína variante de la cápside comprende una sustitución de aminoácidos 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 variante de la cápside comprende entre 1 y 5, entre 5 y 10, o entre 10 y 15 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAV2 como se establece en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización preferidas, la proteína variante de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución de aminoácidos Q164K en

comparación con la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID NO:2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID NO:2. En otras formas de realización la proteína variante de la cápside 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 correspondientes sustituciones en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2) y es por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:2.

[00166] En otras formas de realización una proteína variante de la cápside de AAV 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) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2), en donde el aminoácido sustituido no existe de forma natural en la correspondiente posición. En algunas formas de realización preferidas, la proteína variante de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe 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 isoleucina a valina en el aminoácido 698 en comparación con 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 algunas formas de realización relacionadas, la proteína variante de la cápside comprende una sustitución de aminoácidos 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 variante de la cápside comprende entre 1 y 5, entre 5 y 10, o entre 10 y 15 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAV2 como se establece en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización preferidas, la proteína variante de

la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución de aminoácidos I698V en comparación con la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID NO:2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID NO:2.

[00167] En otras formas de realización una proteína variante de la cápside de AAV 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) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2). En algunas formas de realización preferidas, la proteína variante de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe 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 variante de la cápside comprende una sustitución de aminoácidos 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 algunas formas de realización relacionadas, la proteína variante de la cápside comprende una sustitución de aminoácidos S109T en comparación con la secuencia de aminoácidos AAV2, en donde la proteína variante de la cápside comprende entre 1 y 5, entre 5 y 10, o entre 10 y 15 sustituciones de aminoácidos. En otras formas de realización relacionadas, la proteína variante de la cápside comprende una sustitución de aminoácidos S109T y una sustitución de aminoácidos A593E en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2. En algunas formas de realización la proteína variante de la cápside 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 correspondientes sustituciones en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2) y tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que

se describe en la SEQ ID NO 2. En algunas formas de realización preferidas la proteína variante de la cápside 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 correspondientes sustituciones en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2) y es por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO 2. En otras formas de realización preferidas, la proteína variante de la cápside comprende las sustituciones de aminoácidos S109T y V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 y tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO 2 o, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

[00168] En otras formas de realización una proteína variante de la cápside de AAV 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) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2). En algunas formas de realización preferidas, la proteína variante de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe 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 variante de la cápside comprende una sustitución de aminoácidos 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 arginina a glutamato en el aminoácido 594 de AAV3B, o una sustitución de aminoácidos aspartato a glutamato en el aminoácido 592 de AAV4 o una sustitución de aminoácidos glutamina a glutamato en la posición

595 de AAV7. En otras formas de realización, la proteína variante de la cápside comprende una sustitución de aminoácidos 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 algunas formas de realización relacionadas, la proteína variante de la cápside comprende las sustituciones de aminoácidos A593E y N596D en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% o por lo menos aproximadamente 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO 2. En otras formas de realización, la cápside variante comprende las sustituciones de aminoácidos A593E y N596D 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 por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98% o por lo menos aproximadamente 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO 2. 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, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de AAV2.

[00169] En otras formas de realización una proteína variante de la cápside de AAV 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) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2) en donde el aminoácido sustituido no existe de forma natural en la correspondiente posición. Preferiblemente, el virión de rAAV no comprende una sustitución 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 variante de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la

secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe 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 variante de la cápside comprende una sustitución valina a isoleucina (V708I) en el aminoácido 708 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la cápside de AAV2 y tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO 2 o, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, en donde la proteína variante de la cápside no comprende una sustitución de aminoácidos P250S. En algunas formas de realización, la proteína variante de la cápside comprende una sustitución valina a isoleucina en el aminoácido 709 de AAV3A o AAV3B, una sustitución alanina a isoleucina en la posición 709 de AAV1 o AAV6, una sustitución asparagina a isoleucina en el aminoácido 707 de AAV4 o aminoácido 709 de AAV9 o una sustitución treonina a isoleucina en el aminoácido 710 de AAV7 o aminoácido 711 de AAV8 o AAV10 o una sustitución glutamina a isoleucina en el aminoácido 697 de AAV5. En algunas formas de realización relacionadas, la proteína variante de la cápside comprende una sustitución de aminoácidos V708I en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2, en donde la proteína variante de la cápside comprende entre 2 y 5, entre 5 y 10, o entre 10 y 15 sustituciones de aminoácidos y en donde la proteína variante de la cápside no comprende una sustitución de aminoácidos P250S. En otras formas de realización, la proteína variante de la cápside comprende una sustitución de aminoácidos V708I y también comprende una sustitución de aminoácidos A593E y/o S109T en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2. En otras formas de realización relacionadas, la cápside variante comprende sustituciones de aminoácidos V708I y A593E en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2, en donde la proteína variante de la cápside es, por lo demás, idéntica a la secuencia de aminoácidos de AAV2. En otras formas de realización relacionadas, la cápside variante comprende las sustituciones de aminoácidos V708I y S109T en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2, en donde la proteína variante de la cápside es, por lo demás, idéntica a la secuencia de aminoácidos de AAV2. En otras formas de realización, la proteína variante de la cápside comprende las sustituciones de

aminoácidos V708I y V719M en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO 2 o, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En otras formas de realización, la proteína variante de la cápside comprende las sustituciones de aminoácidos V708I y R733C en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO 2 o, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En otras formas de realización, la proteína variante de la cápside comprende sustituciones de aminoácidos V708I y G727D en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 y tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO 2 o, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

[00170] En otras formas de realización una proteína variante de la cápside de AAV 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) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2), en donde el aminoácido sustituido no existe en forma natural en la posición correspondiente y opcionalmente es distinto a prolina. En algunas formas de realización preferidas, la proteína variante de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe 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 a la sustitución S196P. En formas de realización preferidas, la proteína variante

de la cápside comprende una sustitución de aminoácidos 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 alanina a tirosina en el aminoácido 196 de AAV1 o AAV6; o una sustitución metionina a tirosina en el aminoácido 191 de AAV4; o una sustitución treonina a tirosina en el aminoácido 196 de AAV3A o AAV3B. En una forma de realización relacionada, la proteína variante de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución de aminoácidos S196Y en comparación con la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID NO:2 y, por lo demás, es idéntica a la secuencia de aminoácidos que se describe en la SEQ ID NO:2. En algunas formas de realización relacionadas, la proteína variante de la cápside comprende una sustitución de aminoácidos en el aminoácido 196 distinta a la 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 variante de la cápside comprende entre 1 y 5, entre 5 y 10, o entre 10 y 15 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAV2 como se establece en la SEQ ID NO:2.

[00171] En otras formas de realización una proteína variante de la cápside de AAV 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) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2), en donde el aminoácido sustituido no existe de forma natural en la correspondiente posición. En algunas formas de realización preferidas, la proteína variante de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe 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 describe en la SEQ ID NO:2 o una sustitución Glutamina a histidina en la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental. En algunas formas de realización relacionadas, la proteína variante de la cápside comprende una sustitución de aminoácidos 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 variante de la cápside comprende entre 1 y 5, entre 5 y 10, o entre 10 y 15 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAV2 como se establece en la SEQ ID NO:2.

[00172] En otras formas de realización una proteína variante de la cápside de AAV 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) o la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental (es decir diferente de AAV2), en donde el aminoácido sustituido no existe de forma natural en la correspondiente posición. En algunas formas de realización preferidas, la proteína variante de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe 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 de rAAV comprende una sustitución de aminoácido P64S en comparación con la secuencia de aminoácidos de AAV2 como se describe en la SEQ ID NO:2 o una sustitución prolina a serina en la posición correspondiente en otro serotipo de AAV parental. En algunas formas de realización relacionadas, la proteína variante de la cápside comprende una sustitución de aminoácidos 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 variante de la cápside comprende entre 1 y 5, entre 5 y 10, o entre 10 y 15 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína de la cápside de AAV2 como se establece en la SEQ ID NO:2.

[00173] En otras formas de realización, una proteína variante de la cápside de AAV comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95% o por lo menos 98% idéntica a una secuencia de la cápside de AAV de tipo salvaje 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 aminoácido seleccionada del grupo que consiste en P34A, S109T+V708I, A593E+N596D,

V708I+V719M, V708I+G727D, S109T+A493V+A593E+V708I, V708I+R733C, Q164K, e 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 la una o más sustituciones de aminoácido y/o inserciones de péptido especificadas y, por lo demás, es idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1-12.

[00174] En algunas formas de realización, una proteína variante de la cápside de AAV es una proteína de la cápside ancestral. Una proteína de la cápside ancestral se refiere a un ancestro evolutivo de una proteína de la cápside que se encuentra en la naturaleza en la actualidad, por ejemplo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, que se genera *in silico* mediante sustitución de aminoácidos al azar en las posiciones de degeneración entre las proteínas de la cápside de AAV que se encuentran en la naturaleza en la actualidad. A continuación se provee un ejemplo no limitante 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” :

[00175] MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQ
DDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNP
YLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
GKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDPQLGEPP
AGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVITT
STRTWALPTYNNHLYKQISSXSXGXTNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSP

RDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSD
 SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYF
 PSQMLRTGNNFTFSYTFEDVVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLXRTQST
 GGTAGXXELLFSQXGPXXMSXQAKNWLPGPCYRQQRVSKTLXQNNNSNFA
 WTGATKYHLNGRXSLVNPGVAMATHKDDXRFFPSSGVLIFGKXGAGXNNT
 XLXNVMXTXEEEIKTTNPVATEXYGVVAXNLQSSNTAPXTGXVNSQGALPG
 MVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPA
 NPPXXFXXAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYAKSX
 NVDFAVXXXGVYXEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:58)

[00176] En algunas formas de realización, la proteína de la cápside ancestral comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa que se describe en la SEQ ID NO:58. En algunas formas de realización, la proteína de la cápside ancestral comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa de AAV2, por ejemplo como se describe en la SEQ ID NO 2. En algunas formas de realización, la proteína de la cápside ancestral comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o más de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la secuencia ancestral descrita en SEQ ID NO:58 o en 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) 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. En algunas formas de realización preferidas, la proteína variante de la cápside comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, en algunos casos 100% identidad de secuencia de aminoácidos con 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:

[00177] MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQ
DDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNP
YLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
GKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDPQLGEP
AGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDREVITT
STRTWALPTYNNHLYKQISSASAGSTNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFS
RDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSD
SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYF
PSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHQSQSLDRLMNPLIDQYLYLARTQST
GGTAGTRELLFSQAGPSNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSKTLSQNNNSNFAW
TGATKYHLNGRDSL VNPGVAMATHKDDERFFPSSGVLIFGKQGAGANNTA
LENVMMTSEEEIKTTNPVATEQYGVVASNLQSSNTAPVTGTVNSQGALPGM
VWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANP
PAVFTPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYAKSTNV
DFAVDNEG VYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:59).

[00178] En otras formas de realización, una proteína variante de la cápside de AAV comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos 85%, por lo menos 90%,

por lo menos 95% o por lo menos 98% idéntica a una secuencia de la cápside de AAV de tipo salvaje seleccionada del grupo que consiste en la variante ancestral descrita en la presente como SEQ ID NO:58, 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 aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en P34A, S109T+V708I, A593E+N596D, V708I+V719M, V708I+G727D, S109T+A493V+A593E+V708I, V708I+R733C, Q164K, e 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 la una o más sustituciones de aminoácido y/o inserciones de péptido específicas y, por lo demás, es idéntica a SEQ ID NO:59.

[00179] Las variantes de AAV descritas en la presente se generaron mediante el uso de evolución dirigida *in vivo* que involucra el uso de cribado en retina de primates después de la administración intravítrea. En algunas formas de realización, las proteínas variante de la cápside descritas en la presente, cuando están presentes en un virión de

AAV, confieren transducción aumentada de una célula de la retina en comparación con la transducción de la célula de la retina por un virión de AAV que comprende la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental o AAV de tipo salvaje. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las proteínas variantes de la cápside descritas en la presente, cuando están presentes en un virión de AAV, confieren una transducción más eficaz de células de la retina de primates que los viriones de AAV que comprenden la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental o proteína de tipo salvaje de la cápside de AAV, por ejemplo las células de la retina incorporan más cantidad de viriones de AAV que comprenden la proteína variante de la cápside sujeto de AAV que los viriones de AAV que comprenden la proteína de la cápside de AAV parental o AAV de tipo salvaje. En algunas de dichas formas de realización, el virión variante de AAV o rAAV variante presenta por lo menos 2 veces, por lo menos 5 veces, por lo menos 10 veces, por lo menos 15 veces, por lo menos 20 veces, por lo menos 25 veces, por lo menos 50 veces, o más de 50 veces, transducción aumentada de una célula de la retina, en comparación con la transducción de la célula de la retina por un virión de AAV de tipo salvaje o rAAV que comprende la correspondiente proteína de la cápside del AAV parental. En algunas de dichas formas de realización, las proteínas variantes de la cápside descritas en la presente, cuando están presentes en un virión de AAV, confieren una transducción más amplia de las células de la retina de primates que los viriones de AAV que comprenden la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental o proteína de la cápside de tipo salvaje de AAV. En otras palabras, el virión variante de AAV transduce tipos celulares no transducidos por viriones que comprenden la correspondiente proteína de la cápside del AAV parental, y por lo tanto más tipos de células en la retina que el correspondiente virión de AAV parental. En algunas formas de realización, el virión variante de AAV preferiblemente transduce una célula de la retina, por ejemplo, un virión de rAAV sujeto infecta a célula de la retina con más de 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces, o más que 50 veces, especificidad que otra célula de la retina o una célula que no es de la retina, por ejemplo, una célula externa al ojo. En algunas formas de realización la célula de la retina transducida es una célula fotorreceptora (por ejemplo, bastones; conos). En algunas formas de realización, la célula de la retina es una célula ganglionar de la retina (RGC). En algunas formas de realización, la célula de la retina es una célula del epitelio de la retina (célula RPE). En algunas formas de realización, la célula de la retina es una célula glial de Müller. En algunas formas de realización, la

célula de la retina es una célula de la microglia. En algunas formas de realización, la célula de la retina es una célula amácrina. En algunas formas de realización, la célula de la retina es una célula bipolar. En algunas formas de realización, la célula de la retina es una célula horizontal. Un aumento en la transducción de una célula de la retina, por ejemplo eficacia aumentada de transducción, transducción más amplia, transducción más preferida, etc. se puede evaluar fácilmente *in vitro* o *in vivo* mediante diferentes métodos en la materia para medir la expresión génica. Por ejemplo, el AAV puede ser empaquetado con un genoma que comprende un casete de expresión que comprende un gen reportero, por ejemplo una proteína fluorescente, bajo el control de un promotor ubicuo o específico de tejido, y la cantidad de transducción se puede evaluar mediante la detección de la proteína fluorescente, por ejemplo, mediante microscopía de fluorescencia. Como otro ejemplo, el AAV puede ser empaquetado con un genoma que comprende una secuencia de ácido nucleico código de barras, y la cantidad de transducción se puede evaluar mediante la detección de la secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, mediante PCR. Como otro ejemplo, el AAV puede ser empaquetado 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 cantidad de transducción se puede evaluar mediante la detección del tratamiento de la enfermedad retinal en un paciente afectado que fue administrado con el AAV.

[00180] Las enfermedades oculares que se pueden tratar mediante el uso de un vector o virión de rAAV variante y/o método descritos en la presente incluyen, a título enunciativo no taxativo, enfermedades monogénicas, enfermedades genéticas complejas, enfermedades adquiridas, y lesiones traumáticas. Los ejemplos de enfermedades monogénicas incluyen, a título enunciativo no taxativo, síndrome de Bardet-Biedl; enfermedad de Batten; distrofia del cristalino de Bietti; coroideremia; atrofia coriorretiniana; degeneración coriorretiniana; distrofias de conos o conos-bastones (dominante autosómica, recesiva autosómica, y ligada al X); ceguera nocturna estacionaria congénita (autosómica dominante, recesiva autosómica, y ligada al X); trastornos de la visión en color, que incluye acromatopsia (que incluye ACHM2, ACHM3, ACHM4 y ACHM5), protanopia, deuteranopia, y tritanopia; ataxia de Friedreich; amaurosis congénita de Leber (autosómica dominante y recesiva autosómica), que incluye, a título enunciativo no taxativo, LCA1, LCA2, LCA3, LCA4, LCA6, LCA7, LCA8, LCA12 y LCA15; neuropatía óptica hereditaria de Leber; distrofia macular (autosómica dominante y recesiva autosómica), que incluye, a título

enunciativo no taxativo, degeneración macular aguda, distrofia macular viteliforme de Best, distrofia en patrón, distrofia macular de Carolina del Norte, drusas hereditarias, distrofia de Sorsby del fondo, malattia levantanesa, y retinopatía del prematuro determinada genéticamente; enfermedad del desarrollo óculo-retiniano; albinismo ocular; atrofas ópticas (autosómicas dominantes, recesivas autosómicas, y ligadas al X); retinitis pigmentosa (autosómica dominante, recesiva autosómica, ligada al X, y rasgos de herencia mitocondrial), ejemplos de los cuales incluyen a RP1, RP2, RP3, RP10, RP20, RP38, RP40, y RP43; retinosquiasis ligada al X; enfermedad de Stargardt; y síndrome de Usher, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, USH1B, USH1C, USH1D, USH1F, USH1G, USH2A, USH2C, USH2D, y USH3. Los ejemplos de enfermedades genéticas complejas incluyen, a título enunciativo no taxativo, glaucoma (de ángulo abierto, de ángulo cerrado, de baja tensión, de tensión normal, congénito, neovascular, pigmentario, pseudoexfoliación); degeneración macular relacionada con la edad y otras formas de degeneración macular, tanto formas exudativas como no exudativas (autosómica dominante y recesiva autosómica), tales como degeneración macular aguda, degeneración macular viteliforme; retinopatía del prematuro; y síndrome de Vogt Koyanagi-Harada (VKH). Los ejemplos de enfermedades adquiridas incluyen, a título enunciativo no taxativo, neuroretinopatía macular aguda; neuropatía óptica anterior isquémica y neuropatía óptica posterior isquémica; enfermedad de Behcet; oclusión de rama de la vena de la retina; neovascularización de coroides; retinopatía diabética, incluyendo retinopatía diabética proliferativa y complicaciones asociadas; uveítis diabética; edema, tal como edema macular, edema macular quistoide y edema macular diabético; trastornos de la membrana epiretinal; telangiectasia macular; coroiditis multifocal; disfunción de retina diabética distinta a retinopatía; tumores oculares; atrofas ópticas; desprendimiento de retinal; trastornos de retina, tales como oclusión de la vena central de la retina, vitreoretinopatía proliferativa (PVR), enfermedad por oclusión venosa y arterial de la retina, oclusión vascular, enfermedad uveítica de la retina; efusión uveal; enfermedad infecciosa e infiltrativa de la retina; enfermedades del nervio óptico tales como atrofia óptica adquirida. Los ejemplos de lesiones traumáticas incluyen, a título enunciativo no taxativo, histoplasmosis; lesión del nervio óptico; lesión ocular que afecta un sitio o localización ocular posterior; lesión de la retina; infección viral del ojo; infección viral del nervio óptico; una condición ocular posterior causada o influenciada por un tratamiento ocular con láser; condiciones

oculares posteriores causadas o influenciadas por una terapia fotodinámica; fotocoagulación, retinopatía por radiación; y oftalmia simpática.

[00181] En otra forma de realización, una cápside variante divulgada en la presente comprende un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto génico tal como, sin limitación, un ARN de interferencia, un ARN no codificante largo, un ARN no codificante corto, un ARN antisentido, un aptámero, un polipéptido, un anticuerpo secretado, un anticuerpo de cadena individual, un dominio V_{HH} , un receptor soluble, un affibody, una knottina, un DARPin, una centurina, una chaperona, una nucleasa específica de sitio que provee el silenciamiento específico de sitio de la función génica o una nucleasa modificada específica de sitio que provee la activación de la transcripción específica de genes.

[00182] Un virión de rAAV variante descrito en la presente comprende un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para 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 no codificante largo. En algunas formas de realización, el producto génico es un ARN no codificante corto. 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 de cadena individual. 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 un affibody. En algunas formas de realización, el producto génico es una knottina. En algunas formas de realización, el producto génico es un DARPin. En algunas formas de realización, el producto génico es una centurina. En algunas formas de realización, el producto génico es una chaperona. En algunas formas de realización, el producto génico es una nucleasa específica de sitio que provee una reducción específica de sitio de la función génica.

[00183] Los usos del producto génico incluyen, a título enunciativo no taxativo, aumentar el nivel de un factor en una célula, aumentar el nivel de un factor en una célula vecina a través de 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 se puede diseñar para suplementar el nivel de un

producto génico defectuoso o faltante, disminuir el nivel de un producto génico defectuoso o faltante, introducir un nuevo producto génico de soporte, suplementar el nivel de un producto génico soporte, disminuir el nivel de un producto génico perjudicial, o tanto disminuir el nivel de un producto génico perjudicial como introducir o suplementar el nivel de un producto génico de soporte.

[00184] Los productos génicos administrados por las variantes de AAV de la invención se pueden usar para alterar el nivel de productos génicos o la actividad de productos génicos directamente o indirectamente en conexión con enfermedades y lesiones de la retina. Los genes cuyos productos génicos están directa o indirectamente conectados con enfermedades genéticas incluyen, por ejemplo, proteína 6 similar a factor de ribosilación de ADP (ARL6); proteína de interacción con BBSoma 1 (BBIP1); proteína de BBSoma 1 (BBS1); proteína de BBSoma 2 (BBS2); proteína de BBSoma 4 (BBS4); proteína de BBSoma 5 (BBS5); proteína de BBSoma 7 (BBS7); proteína de BBSoma 9 (BBS9); proteína de BBSoma 10 (BBS10); proteína de BBSoma 12 (BBS12); proteína de centrosoma de 290 kDa (CEP290); proteína de transporte intraflagelar 172 (IFT172); proteína de transporte intraflagelar 27 (IFT27); inositol polifosfato-5-fosfatasa E (INPP5E); canal de rectificación de potasio hacia adentro subfamilia J miembro 13 (KCNJ13); factor de transcripción similar a cremallera de leucina-1 (LZTFL1); proteína del síndrome de McKusick-Kaufman (MKKS); proteína de síndrome de Meckel de tipo 1 (MKS1); proteína de nefronoftisis 3 (NPHP1); antígeno 8 de cáncer de colon definido serológicamente (SDCCAG8); proteína 32 que contiene motivo tripartito (TRIM32); dominio repetitivo de tetratricopéptido 8 (TTC8); proteína de enfermedad de Batten (CLN3); proteína 1 de acompañamiento de Rab (CHM); (PRDM13); (RGR); (TEAD1); proteína 1 similar a proteína receptora de interacción con arilhidrocarburos (AIPL1); factor de transcripción homeobox de fotorreceptor de conos-bastones similar a otx (CRX); proteína 1 A activante de guanilato ciclasa (GUCA1A); guanilato ciclasa específica de retina (GUCY2D); miembro 3 de la familia asociada a membrana de transferencia de fosfatidilinositol (PITPNM3); prominina 1 (PROM1); periferina (PRPH); periferina 2 (PRPH2); proteína 1 de regulación de exocitosis de membrana sináptica (RIMS1); semaforina 4A (SEMA4A); homólogo humano de proteína unc119 de *C. elegans* (UNC119); transportador de casete de unión a ATP – de la retina (ABCA4); dominio metalopeptidasa ADAM 9 (ADAM9); factor de activación de la transcripción 6 (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 alfa 2/delta 4 (CACNA2D4); miembro 1 de la familia relacionada con la cadherina (protocadherina 21) (CDHR1); proteína similar a ceramida quinasa (CERKL); subunidad alfa de canal catiónico activado por cGMP de fotorreceptores de conos (CNGA3); subunidad beta 3 de canal de cationes de conos activado por nucleótido cíclico (CNGB3); ciclina M4 (CNNM4); proteína de unión a nucleótido de guanina (proteína G); polipéptido 2 de actividad de transducción alfa (GNAT2); canal de potasio subfamilia V miembro 2 (KCNV2); Fosfodiesterasa 6C (PDE6C); Fosfodiesterasa 6H (PDE6H); proteína centriolar B de proteoma de centriolo 1 (POC1B); miembro RAB28 de la familia de oncogenes RAS (RAB28); factor de transcripción con homeobox 2 de plegamiento neural de retina y anterior (RAX2); 11-cis retinol deshidrogenasa 5 (RDH5); proteína 1 de interacción con regulador de RP GTPasa (RPGRIP1); miembro 5 de la familia similar a tirosina ligasa de tubulina (TTLL5); subunidad alfa-1 de canal de calcio activado por voltaje tipo L (CACNA1F); regulador de GTPasa de retinitis pigmentosa (RPGR); (GNAT1); (PDE6B); (RHO); CABP4); GPR179); (GRK1); GRM6); LRIT3); SLC24A1); TRPM1); NYX); OPN1LW); OPN1MW); opsina de los conos azules (OPN1SW); frataxina (FXN); (IMPDH1); (OTX2); CRB1); DTHD1GDF6); IFT140); IQCB1); LCA5); LRAT); NMNAT1); RD3); RDH12); RPE65); SPATA7); TULP1); genes mitocondriales (KSS, LHON, MT-ATP6, MT-TH, MT-TL1, MT-TP, MT-TS2, NADH deshidrogenasas codificadas en las mitocondrias [MT-ND]); (BEST1);C1QTNF5EFEMP1); ELOVL4); FSCN2); GUCA1B); HMCN1); IMPG1); RP1L1); TIMP3); DRAM2); MFN2); NR2F1); atrofia óptica 1 (OPA1); TMEM126A); TIMM8A); CA4); HK1); KLHL7); NR2E3); NRL); OR2W3); PRPF3); PRPF4); PRPF6); PRPF8); PRPF31); ROM1); proteína pigmentosa de retinitis 1 (RP1); RP9); SNRNP200); SPP2); TOPORS); ARL2BP); C2orf71); CLRN1); CNGA1); CNGB1); CYP4V2); DHDDS); DHX38); EMC1); EYS); FAM161A); GPR125); HGSNAT); IDH3B); IMPG2); KIAA1549); KIZ); MAK); MERTK); MVK); NEK2); NEUROD1); PDE6A); PDE6G); PRCD); RBP3); RLBP1); SLC7A14); USH2A); ZNF408); ZNF513); OFD1); RP2); retinosquisina (RS1); ABHD12); CDH23); CEP250); CIB2); DFNB31); GPR98); HARS); MYO7A); PCDH15); USH1C); USH1G); NDP); PGK1); CAPN5); FZD4); ITM2B); LRP5); MIR204); RB1); TSPAN12); C12orf65); CDH3); MFRP); OAT); PLA2G5); RBP4); RGS9); RGS9BP); ARMS2); ERCC6); FBLN5); HTRA1); TLR3); y TLR4).

[00185] Los genes cuyos productos génicos inducen o promueven la apoptosis se denominan en la presente “genes proapoptóticos” y los productos de dichos genes (ARNm; proteína) se denominan “productos génicos proapoptóticos”. Las dianas proapoptóticas incluyen, por ejemplo, productos génicos de Bax; productos génicos de Bid; productos génicos de Bak; productos génicos de Bad; Bcl-2; Bcl-X1. Los productos génicos antiapoptóticos incluyen al inhibidor de apoptosis ligado al X.

[00186] Los genes cuyos productos génicos inducen o promueven la angiogénesis se denominan en la presente “genes proangiogénicos” y los productos de dichos genes (ARNm; proteína) se denominan “productos génicos proangiogénicos”. Las dianas proangiogénicas incluyen, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFa, VEGFb, VEGFc, VEGFd); receptor 1 de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR1); receptor 2 de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR2); Tirosina Quinasa 1 relacionada con Fms (Flt1); factor de crecimiento de 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 dichos genes (ARNm; proteína) se denominan “productos génicos antiangiogénicos”. Los productos génicos antiangiogénicos incluyen endostatina; tumstatina; angiostatina; factor derivado de 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 contra VEGF LucentisTM y AvastinTM, etc.

[00187] En algunas formas de realización, el o los productos génicos administrados por las variantes de AAV de la invención actúan inhibiendo la angiogénesis. En ciertas formas de realización preferidas, el o los productos génicos administrados por las variantes de AAV de la invención actúan inhibiendo la actividad de una o más proteínas VEGF de mamífero que se seleccionan del grupo que consiste en VEGFa, VEGFb, VEGFc, VEGFd y PGF. En formas de realización particularmente preferidas, el o los productos génicos administrados por las variantes de AAV de la invención inhiben la actividad de VEGFa. El VEGFa tiene 9 isoformas generadas por corte y empalme alternativo, en donde el fisiológicamente más relevante es el VEGF165. Los niveles de VEGFa se han hallado elevados en el humor vítreo de pacientes con degeneración macular húmeda relacionada con la edad, edema macular diabético y oclusión de la vena de la retina. El o los productos génicos que inhiben la

actividad de VEGFa en el ojo y que por lo tanto son eficaces para tratar pacientes con VEGFa elevado en humor vítreo incluyen, a título enunciativo no taxativo, Aflibercept, Ranibizumab, Brolucizumab, Bevacizumab, y tirosina quinasa 1 similar a fms soluble (sFLT1) (No. de Acc. a GenBank U01134). En algunas formas de realización, se provee un virión recombinante de AAV (rAAV) infeccioso que comprende (i) una proteína variante de la cápside de AAV como se describe en la presente y (ii) un ácido nucleico heterólogo que comprende múltiples secuencias, cada uno de las cuales codifica para un inhibidor de VEGFa diferente.

[00188] En una forma de realización preferida, el producto génico es Aflibercept. El Aflibercept (EYLEA®) es una proteína de fusión recombinante que comprende dominios extracelulares de los receptores de VEGF humano 1 y 2 fusionados a la parte Fc de la IgG1 humana. El Aflibercept actúa como un receptor señuelo soluble que se une a VEGFa y PGF con mayor afinidad que los receptores nativos. La dosis aprobada de inyección intravítrea de Aflibercept es de 2,0 mg, cuya dosificación varía de acuerdo con la indicación. El Aflibercept está indicado para el tratamiento de degeneración macular (húmeda) neovascular relacionada con la edad, edema macular posterior a oclusión de la vena de la retina, edema macular diabético y retinopatía diabética. En una forma de realización particularmente preferida, se provee una nueva secuencia de ácido nucleico de codones optimizados que codifica para Aflibercept (que corresponde a la **Figura 12A**) que comprende o consiste en:

[00189] ATGGTTTCTTACTGGGACACCGGCGTGCTGCTGTGTGCCC
TGCTTTCTTGTCTGCTGCTGACCGGCTCTAGCAGCGGCTCTGATACCGGCA
GACCCTTCGTGGAATGTACAGCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACC
GAGGGCAGAGAGCTGGTCATCCCTTGCAGAGTGACAAGCCCCAACATCAC
CGTGACTCTGAAGAAGTTCCCTCTGGACACACTGATCCCCGACGGCAAGA
GAATCATCTGGGACAGCCGGAAGGGCTTCATCATCAGCAACGCCACCTAC
AAAGAGATCGGCCTGCTGACCTGTGAAGCCACCGTGAATGGCCACCTGTA
CAAGACCAACTACCTGACACACAGACAGACCAACACCATCATCGACGTGG
TGCTGAGCCCTAGCCACGGCATTGAACTGTCTGTGGGCGAGAAGCTGGTG
CTGAACTGTACCGCCAGAACCGAGCTGAACGTGGGCATCGACTTCAACTG
GGAGTACCCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGAACTGGTCAACCGGGAC
CTGAAAACCCAGAGCGGCAGCGAGATGAAGAAATTCCTGAGCACCTGA
CCATCGACGGCGTGACCAGAAGTGACCAGGGCCTGTACACATGTGCCGCC
AGCTCTGGCCTGATGACCAAGAAAAACAGCACCTTCGTGCGGGTGACGA

GAAGGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCG
 GCGGACCTTCCGTGTTCTCTGTTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGA
 TCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAG
 GATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAA
 CGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAATAGCACCTACAGAGTG
 GTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTA
 CAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCA
 TCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCCAAGGTTTACACACTGCCT
 CCAAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGT
 CAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAATGGCC
 AGCCTGAGAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGC
 TCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGAGCAGATGGCAGCA
 GGGCAACGTGTTTACAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT
 ACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAATGA (SEQ ID NO:65).

[00190] En algunas formas de realización, se provee una secuencia de ácido nucleico que codifica para Aflibercept que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o mayor, identidad de ácido nucleico con la longitud completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en la SEQ ID NO:65 o con los nucleótidos 79-1377 de la SEQ ID NO:65 (sin los nucleótidos subrayados que codifican para la secuencia señal Flt1). En algunas formas de realización relacionadas, el o los productos génicos administrados por la o las variantes de AAV sujeto están codificados por una secuencia de ácido nucleico que consiste en o que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:65 o un ácido nucleico por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% idéntica a la misma. En otras formas de realización relacionadas, el o los productos génicos administrados por las variantes de AAV de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos

aproximadamente 99% idéntica o 100% idéntica a la siguiente secuencia de aminoácidos:

[00191] MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSDTGRPFVEMYSEIPE
IIHMTGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYK
EIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTA
RTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS
DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID
NO:66)

[00192] En otras formas de realización relacionadas, la o las variantes de AAV comprenden un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% idéntica o 100% idéntica a los aminoácidos 27-458 de la SEQ ID NO:66 (correspondiente a la secuencia de aminoácidos de Aflibercept sin la secuencia señal peptídica subrayada).

[00193] En otra forma de realización preferida, el producto génico es una versión de cadena simple de Ranibizumab (sc-Ranibizumab). Ranibizumab (LUCENTIS®) es un fragmento de anticuerpo IgG1 monoclonal (Fab) que se une y bloquea todas las isoformas de VEGFa. El LUCENTIS® se expresa en bacterias como dos cadenas separadas (liviana y pesada) que están unidas por un puente disulfuro entre los dominios liviano constante (CL) y pesado constante 1 (CH1). La dosis intravítrea aprobada de Ranibizumab es 0,3 o 0,5 mg en 0,05 mL dependiendo de la indicación. El Ranibizumab está aprobado para el tratamiento de degeneración macular húmeda relacionada con la edad, edema macular posterior a oclusión de la vena de la retina, edema macular diabético y retinopatía diabética. En una forma de realización particularmente preferida, se provee una nueva secuencia de ácido nucleico de codones optimizados que codifica para una forma Pesada-Liviana (HL) de cadena simple de Ranibizumab (sc-Ranibizumab HL) correspondiente a la **Figura 12C**, en donde la secuencia de ácido nucleico comprende o consiste en:

[00194] ATGGACTGGACCTGGTCCATCCTGTTTCTGGTGGCTGCCG
CCACAGGCACATACTCTGAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTT
GTTCAACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCTCTGGCTACGAC
TTTACCCACTACGGCATGAACTGGGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCT
TGAATGGGTCGGATGGATCAACACCTACACCGGCGAGCCAACATACGCCG
CCGACTTCAAGCGGAGATTCACCTTCAGCCTGGACACCAGCAAGAGCACC
GCCTACCTCCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA
CTGCGCCAAGTATCCCTACTACTACGGCACCAGCCACTGGTACTTCGACGT
GTGGGGACAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCC
CCAGCGTTTTCCCACTGGCTCCTAGCAGCAAGTCTACCTCCGGTGGAACAG
CCGCTCTGGGCTGTCTGGTCAAGGACTACTTTCCCGAGCCTGTGACCGTGT
CCTGGAATAGCGGAGCACTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTG
CTGCAAAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCAAG
CAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTA
GCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGAC
ACACCTCGGCGGAAGCTCTGGAAGCGGCTCTGGATCTACCGGCACAAGCT
CTAGCGGAACAGGCACAAGCGCTGGCACAACCGGAACAAGCGCTTCTAC
ATCTGGCTCTGGTTCTGGCGGAGGCGGAGGATCAGGTGGTGGTGGATCTG
CTGGCGGAACAGCTACAGCTGGCGCCTCTTCTGGCAGCGACATTCAGCTG
ACACAGAGCCCTTCTAGCCTGAGCGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCAT
CACATGTAGCGCCAGCCAGGACATCTCCAACCTGAACTGGTATCAGC
AGAAGCCCGGCAAGGCCCTAAGGTGCTGATCTACTTTACCAGCAGCCTG
CACTCCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGATCTGGCTCCGGCACCGACTTC
ACCCTGACAATATCTAGCCTCCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGC
CAGCAGTACAGCACCGTGCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACAAAGGTGGA
AATCAAGCGGACAGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGA
CGAGCAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACT
TCTACCCCAGAGAAGCCAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTCCAG
TCCGGCAACAGCCAAGAGTCTGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCA
CCTACAGCCTGTCCAGCACACTGACACTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG
CACAAAGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGT
GACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGTTGA (SEQ ID NO:67)

[00195] En algunas formas de realización, se provee una secuencia de ácido nucleico que codifica para sc-Ranibizumab HL que comprende una secuencia de ácido

nucleico que tiene por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o mayor, identidad de ácido nucleico con la longitud completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en SEQ ID NO:67 o con los nucleótidos 58-1575 de la SEQ ID NO:67 (sin los nucleótidos subrayados que codifican para la secuencia señal IGHV7-8 de humano). En algunas formas de realización relacionadas, el o los productos génicos administrados por la o las variantes de AAV sujeto están codificados por una secuencia de ácido nucleico que consiste en o que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:67 o un ácido nucleico por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% idéntica a la misma. En otras formas de realización relacionadas, el o los productos génicos administrados por la o las variantes de AAV sujeto comprenden una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% idéntica o 100% idéntica a la siguiente secuencia de aminoácidos:

[00196] MDWTWSILFLVAAATGTYSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC
AASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSL
DTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGLTVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THLGGSSGSGSGSTGTSSSGTGTSAGTTGTSASTSGSGSGGGGSGGGGSAGG
TATAGASSGSDIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKA
PKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTF
GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:68).

[00197] En otras formas de realización relacionadas, la o las variantes de AAV comprenden un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos por lo menos

aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% idéntica o 100% idéntica a los aminoácidos 20-524 de la SEQ ID NO:68 (correspondiente a la secuencia de aminoácidos de sc-Ranibizumab HL sin la secuencia señal peptídica subrayada).

[00198] En otra forma de realización particularmente preferida, se provee una nueva secuencia de ácido nucleico de codones optimizados que codifica para una forma Liviana-Pesada (LH) de cadena simple de Ranibizumab (sc-Ranibizumab LH) correspondiente a la **Figura 12B**, en donde la secuencia de ácido nucleico comprende o consiste en:

[00199] ATGGTCCTCCAGACACAGGTGTTTCATCAGCCTGCTGCTGT
GGATCTCTGGCGCCTACGGCGATATCCAGCTGACACAGAGCCCTAGCAGC
CTGTCTGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGTAGCGCCAGCCA
GGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCC
CTAAGGTGCTGATCTACTTTACCAGCAGCCTGCACAGCGGCGTGCCCAGC
AGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACAATATCTAGC
CTCCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGT
GCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACAGTGG
CCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTG
GCACAGCCTCTGTTCGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCAGAGAAGCC
AAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTCCAGAGCGGCAATAGCCAAG
AGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCTACCTACTCTCTGAGCAGC
ACACTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTG
CGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACA
GAGGCGAGTGTGGCGGCAGCTCTGGAAGCGGATCTGGAAGCACAGGCAC
AAGCTCTAGCGGAACCGGAACAAGCGCTGGCACAACAGGCACATCTGCC
AGCACAAGCGGTTCTGGTTCTGGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGG
ATCTGCTGGCGGAACAGCTACAGCTGGTGCCTCTTCTGGATCCGAGGTGC
AGCTGGTTGAATCTGGCGGTGGACTGGTTCAGCCAGGCGGATCTCTGAGA
CTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTACGATTTACCCACTACGGCATGAACTGG
GTCCGACAGGCCCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGGATGGATCAACAC
CTACACCGGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTCACCT
TCAGCCTGGACACCTCCAAGAGCACCGCCTACCTCCAGATGAACAGCCTG
AGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATCCCTACTACTA

CGGCACCAGCCACTGGTACTTCGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCA
 CAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTCCCACTGGCTCCTA
 GCAGCAAGAGCACATCAGGCGGAAGTGTGCCCTGGGCTGTCTGGTCAAG
 GACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCACTGAC
 ATCTGGCGTGCACACCTTTCAGCCGTGCTCCAAAGCAGCGGCCTGTATTC
 TCTGTCCAGCGTCGTGACAGTGCCTAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTA
 CATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTCGACAAGAAG
 GTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACCTCTGA (SEQ ID NO:69)

[00200] En otra forma de realización particularmente preferida, se provee una nueva secuencia de ácido nucleico de codones optimizados que codifica para una forma Liviana-Pesada (LH) de cadena simple de Ranibizumab (sc-Ranibizumab LH) correspondiente a la **Figura 12B**, en donde la secuencia de ácido nucleico comprende o consiste en:

[00201] ATGGTGCTCCAGACCCAGGTGTTTATTTCACTGCTGCTGT
GGATTAGCGGGGCTTACGGAGACATTCAGCTGACCCAGAGTCCTTCATCT
 CTGAGCGCCTCCGTGGGCGACAGGGTGACCATCACATGCTCTGCCAGCCA
 GGATATCTCCAACTATCTGAATTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCC
 CTAAGGTGCTGATCTATTTACACAGCTCCCTGCACAGCGGAGTGCCATCCC
 GCTTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTTACCCTGACAATCTCTAGCC
 TCCAGCCAGAGGATTTGCCACATACTATTGCCAGCAGTACAGCACCGTG
 CCCTGGACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGGACAGTGGC
 CGCCCCAAGCGTGTTTCATCTTTCCCCCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGG
 CACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTTCTATCCCAGAGAGGCCA
 AGGTGCAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAGTCCGGCAATTCTCAGGAG
 AGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGATTCTACATACAGCCTGTCCTCTAC
 CCTGACACTGTCCAAGGCCGACTATGAGAAGCACAAGGTGTACGCATGCG
 AGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCAGTGACAAAGAGCTTTAACAGG
 GGAGAGTGTGGAGGATCTAGCGGATCCGGATCTGGAAGCACCGGCACATC
 CTCTAGCGGAACCGGCACAAGCGCCGGCACCACAGGCACCTCCGCCTCTA
 CAAGCGGCAGCGGATCTGGCGGAGGAGGAGGATCCGGAGGAGGAGGATC
 TGCCGGCGGCACCGCCACAGCCGGCGCCTCCTCTGGCTCCGAGGTGCAGC
 TGGTGGAGTCTGGAGGAGGCCTGGTGCAGCCTGGAGGCTCCCTGAGGCTG
 TCTTGCGCAGCAAGCGGCTATGATTTACCCACTACGGAATGAACTGGGT
 GCGCCAGGCACCTGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGGGCTGGATCAATACCT

ATACAGGCGAGCCAACCTACGCCGCCGACTTTAAGCGGAGATTCACATTT
TCCCTGGATAACCAGCAAGTCCACAGCCTACCTCCAGATGAACAGCCTGAG
GGCAGAGGACACCGCCGTGTACTATTGCGCCAAGTATCCTTACTATTACG
GCACAAGCCACTGGTACTTCGACGTGTGGGGACAGGGCACCCCTGGTGACA
GTGAGCTCCGCCAGCACCAAGGGCCCATCCGTGTTTCCTCTGGCCCCATCT
AGCAAGTCTACCAGCGGAGGAACAGCCGCCCTGGGATGTCTGGTGAAGG
ACTACTTCCCAGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCTGACCT
CCGGCGTGACACATTTCCCGCCGTGCTCCAGTCCTCTGGCCTGTATAGCC
TGAGCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCTAGCTCCCTGGGCACCCAGACATACA
TCTGTAACGTGAATCACAAGCCTTCAAATACCAAAGTCGATAAAAAAGTG
GAACCAAATCCTGTGATAAAACCCATCTGTGA (SEQ ID NO:70).

[00202] En algunas formas de realización, se provee una secuencia de ácido nucleico que codifica para sc-Ranibizumab LH que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o mayor, identidad de ácido nucleico con la longitud completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en SEQ ID NO:69 o SEQ ID NO:70 o con los nucleótidos 61-1578 de la SEQ ID NO:69 o SEQ ID NO:70 (sin los nucleótidos subrayados que codifican para la secuencia señal de Ig kappa). En algunas formas de realización relacionadas, el o los productos génicos administrados por la o las variantes de AAV sujeto están codificados por una secuencia de ácido nucleico que consiste en o que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:69 o SEQ ID NO:70 o a ácido nucleico por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% idéntica a la misma. En otras formas de realización relacionadas, el o los productos génicos administrados por la o las variantes de AAV sujeto comprende una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% idéntica o 100% idéntica a la siguiente secuencia de aminoácidos:

[00203] MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQLTQSPSSLSASVGDRVIT
CSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGSSGSGSGSTGTSSSGTG
TSAGTTGTSASTSGSGSGGGGGSGGGGSAGGTATAGASSGSEVQLVESGGGL
VQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYA
ADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDV
WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHL (SEQ ID NO:71)

[00204] En otras formas de realización relacionadas, la o las variantes de AAV comprenden un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% idéntica o 100% idéntica a los aminoácidos 21-525 de la SEQ ID NO:71 (correspondiente a la secuencia de aminoácidos de sc-Ranibizumab LH sin la secuencia señal peptídica subrayada).

[00205] En otra forma de realización preferida, se provee una secuencia de ácido nucleico novedosa que codifica para una forma Liviana-Pesada (LH) de cadena simple de Ranibizumab fusionada a la región Fc de IgG1 humana (sc-Ranibizumab-Fc) correspondiente a la **Figura 12E**, en donde la secuencia de ácido nucleico comprende o consiste en:

[00206] ATGGTCCTCCAGACACAGGTGTTTCATCAGCCTGCTGCTGT
GGATCTCTGGCGCCTACGGCGATATCCAGCTGACACAGAGCCCTAGCAGC
CTGTCTGCCTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACATGTAGCGCCAGCCA
GGACATCAGCAACTACCTGAACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCC
CTAAGGTGCTGATCTACTTTACCAGCAGCCTGCACAGCGGCGTGCCCAGC
AGATTTTCTGGCTCTGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACAATATCTAGC
CTCCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCACCGT
GCCTTGGACATTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACAGTGG
CCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTTTCCACCTAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTG
GCACAGCCTCTGTGCTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCCAGAGAAGCC

AAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTCCAGAGCGGCAATAGCCAAG
AGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCTACCTACTCTCTGAGCAGC
ACACTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGTGTACGCCTG
CGAAGTGACCCACCAGGGCCTTTCTAGCCCTGTGACCAAGAGCTTCAACA
GAGGCGAGTGTGGCGGCAGCTCTGGAAGCGGATCTGGAAGCACAGGCAC
AAGCTCTAGCGGAACCGGAACAAGCGCTGGCACAACAGGCACATCTGCC
AGCACAAGCGGTTCTGGTTCTGGCGGAGGCGGAGGATCTGGTGGTGGCGG
ATCTGCTGGCGGAACAGCTACAGCTGGTGCCTCTTCTGGATCCGAGGTGC
AGCTGGTTGAATCTGGCGGTGGACTGGTTCAGCCAGGCGGATCTCTGAGA
CTGTCTTGTGCCGCCAGCGGCTACGATTTACCCACTACGGCATGAACTGG
GTCCGACAGGCCCCCTGGCAAAGGCCTTGAATGGGTCGGATGGATCAACAC
CTACACCGGCGAGCCAACATACGCCGCCGACTTCAAGCGGAGATTACCT
TCAGCCTGGACACCTCCAAGAGCACCGCCTACCTCCAGATGAACAGCCTG
AGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGTATCCCTACTACTA
CGGCACCAGCCACTGGTACTTCGACGTGTGGGGACAGGGCACACTGGTCA
CAGTGTCTAGCGCCTCTACAAAGGGCCCCAGCGTTTTCCCACTGGCTCCTA
GCAGCAAGAGCACATCAGGCGGAAGTGTGCTGCCCTGGGCTGTCTGGTCAAG
GACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCACTGAC
ATCTGGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTCCAAAGCAGCGGCCTGTATTC
TCTGTCCAGCGTCGTGACAGTGCCTAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTA
CATCTGCAATGTGAACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTCGACAAGAAG
GTGGAACCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGC
TCCAGAAGTGTCTGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCCTCCAAAGCCTAA
GGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGG
ATGTGTCCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGC
GTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAATA
GCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCTGCACCAGGATTGGCTG
AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCTCC
TATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAG
GTTTACACACTGCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGTGTC
CCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAATG
GGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACAACCCCTCCTGTGC
TGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAG
AGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGC

CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCAAAT
GAGCCACGCGTAACACGTGCATGCGAGAGATCTGA (SEQ ID NO:72).

[00207] En algunas formas de realización, se provee una secuencia de ácido nucleico que codifica para sc-Ranibizumab-Fc que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o mayor, identidad de ácido nucleico con la longitud completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en SEQ ID NO:72 o con los nucleótidos 61-2277 de la SEQ ID NO:72 (sin los nucleótidos subrayados que codifica para la secuencia señal de Ig kappa). En algunas formas de realización relacionadas, el o los productos génicos administrados por las variantes de AAV de la invención están codificados por una secuencia de ácido nucleico que consiste en o que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:72 o un ácido nucleico por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% idéntico a la misma. En otras formas de realización relacionadas, el o los productos génicos administrados por la o las variantes de AAV sujeto comprenden una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% idéntica o 100% idéntica a la siguiente secuencia de aminoácidos:

[00208] MVLQTQVFISLLWISGAYGDIQLTQSPSSLSASVGDRVITIT
CSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTIS
SLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTTL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSSGSGSGTGTSSSGTG
TSAGTTGTSASTSGSGSGGGGGSGGGGSAGGTATAGASSGSEVQLVESGGGL
VQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYA
ADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDV
WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV

DKKVEPKSCDKTHLDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 73)

[00209] En otras formas de realización relacionadas, la o las variantes de AAV comprenden un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% idéntica o 100% idéntica a los aminoácidos 21-752 de la SEQ ID NO:73 (correspondiente a la secuencia de aminoácidos de sc-Ranibizumab-Fc sin la secuencia señal peptídica subrayada).

[00210] En otra forma de realización preferida, el producto génico es Brolucizumab. El Brolucizumab (RTH258) es un fragmento variable de cadena simple (scFv) que se une y bloquea todas isoformas de VEGFa. El Brolucizumab se encuentra actualmente en estudios clínicos de Fase III que evalúan las dosis de 3 mg y 6 mg para el tratamiento de degeneración macular húmeda relacionada con la edad. En una forma de realización particularmente preferida, se provee una nueva secuencia de ácido nucleico de codones optimizados que codifica para Brolucizumab (correspondiente a la **Figura 12D**), en donde la secuencia de ácido nucleico comprende o consiste en:

[00211] ATGGTCCTCCAGACACAGGTGTTTCATCAGCCTGCTGCTGT
GGATCTCTGGCGCCTATGGCGAGATCGTGATGACACAGAGCCCCAGCACA
CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGATCATCACATGCCAGGCCAGCGA
GATCATCCACAGCTGGCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCC
CTAAGCTGCTGATCTACCTGGCCTCTACACTGGCCAGCGGAGTGCCTAGC
AGATTTTCTGGCTCTGGATCTGGCGCCGAGTTCACCCTGACAATCTCTAGC
CTCCAGCCTGACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGAACGTGTACCTGGCC
AGCACCAACGGCGCCAATTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGACAGTGCTTGG
CGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGCGGAGGAAGTGGCGGCGGAGGATCAGGC
GGTGGTGGATCTGAAGTGCAGCTGGTGGGAATCAGGCGGAGGACTGGTTCA
ACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTACCGCCTCTGGCTTCTCCCTGAC
CGACTACTACTACATGACCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAAGGACTTG
AGTGGGTTCGGATTTCATCGACCCCGACGACGATCCTTACTACGCCACATGG

GCCAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGT
ACCTCCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGT
GCCGGCGGAGATCACAATAGCGGCTGGGGACTCGATATCTGGGGCCAGG
GAACACTGGTCACCGTGTCTAGTTGA (SEQ ID NO:74).

[00212] En algunas formas de realización, se provee una secuencia de ácido nucleico que codifica para Brolucizumab que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o mayor, identidad de ácido nucleico con la longitud completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en SEQ ID NO:74 o con los nucleótidos 61-816 de la SEQ ID NO:74 (sin los nucleótidos subrayados que codifican para la secuencia señal de Ig kappa). En algunas formas de realización relacionadas, el o los productos génicos administrados por las variantes de AAV de la invención están codificados por una secuencia de ácido nucleico que consiste en o que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:74 o un ácido nucleico por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% idéntico a la misma. En otras formas de realización relacionadas, el o los productos génicos administrados por las variantes de AAV de la invención comprenden una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% idéntica o 100% idéntica a la siguiente secuencia de aminoácidos:

[00213] MVLQTQVFISLLWISGAYGEIVMTQSPSTLSASVGDRVIITC
QASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTISS
LQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSG
GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLE
WVGFI DPDDDPYYATWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAG
GDHNSGWGLDIWGQGLVTVSS (SEQ ID NO:75)

[00214] En otras formas de realización relacionadas, la o las variantes de AAV comprenden un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de

nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% idéntica o 100% idéntica a los aminoácidos 21-271 de la SEQ ID NO:75 (correspondiente a la secuencia de aminoácidos de Brolucizumab sin la secuencia señal peptídica subrayada).

[00215] En otra forma de realización preferida, se provee una secuencia de ácido nucleico novedosa que codifica para Brolucizumab fusionada a la región Fc de IgG1 humana (Brolucizumab-Fc) correspondiente a la **Figura 12F**, en donde la secuencia de ácido nucleico comprende o consiste en:

[00216] ATGGTCCTCCAGACACAGGTGTTTCATCAGCCTGCTGCTGT
GGATCTCTGGCGCCTATGGCGAGATCGTGATGACACAGAGCCCCAGCACA
CTGTCTGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGATCATCACATGCCAGGCCAGCGA
GATCATCCACAGCTGGCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCC
CTAAGCTGCTGATCTACCTGGCCTCTACACTGGCCAGCGGAGTGCCTAGC
AGATTTTCTGGCTCTGGATCTGGCGCCGAGTTCACCCTGACAATCTCTAGC
CTCCAGCCTGACGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGAACGTGTACCTGGCC
AGCACCAACGGCGCCAATTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGACAGTGCTTGG
CGGAGGCGGAGGTTCTGGTGGCGGAGGAAGTGGCGGCGGAGGATCAGGC
GGTGGTGGATCTGAAGTGCAGCTGGTGGAAATCAGGCGGAGGACTGGTTCA
ACCTGGCGGCTCTCTGAGACTGAGCTGTACCGCCTCTGGCTTCTCCCTGAC
CGACTACTACTACATGACCTGGGTCCGACAGGCCCCCTGGCAAAGGACTTG
AGTGGGTTCGGATTTCATCGACCCCGACGACGATCCTTACTACGCCACATGG
GCCAAGGGCAGATTACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGT
ACCTCCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGTGTACTATTGT
GCCGGCGGAGATCACAATAGCGGCTGGGGACTCGATATCTGGGGCCAGG
GAACACTGGTCACCGTGTCTAGTGACAAGACCCACACCTGTCTCCATGTC
CTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTTCCTCCAAAGC
CTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG
GTGGATGTGTCCACGAGGATCCCGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGA
CGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTAC
AATAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTG
GCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTG
CTCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCC

CAGGTTTACACACTGCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACAAAGAACCAGGT
 GTCCCTGACCTGCCTGGTCAAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGA
 ATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACAACCCCTCCTG
 TGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGAC
 AAGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCTCCGTGATGCACGA
 GGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGTCTCCTGGCA
 AATGAGCCACGCGTAACACGTGCATGCGAGAGATCTGA (SEQ ID NO:76).

[00217] En algunas formas de realización, se provee una secuencia de ácido nucleico que codifica para Brolucizumab-Fc que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99%, o mayor, identidad de ácido nucleico con la longitud completa de la secuencia de ácido nucleico descrita en SEQ ID NO:76 o con los nucleótidos 61-1530 de la SEQ ID NO:76 (sin los nucleótidos subrayados que codifican para la secuencia señal de Ig kappa). En algunas formas de realización relacionadas, el o los productos génicos administrados por las variantes de AAV de la invención están codificados por una secuencia de ácido nucleico que consiste en o que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:76 o un ácido nucleico por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% idéntico a la misma. En otras formas de realización relacionadas, el o los productos génicos administrados por la o las variantes de AAV sujeto comprenden una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% idéntica o 100% idéntica a la siguiente secuencia de aminoácidos.

[00218] MVLQTQVFISLLLWISGAYGEIVMTQSPSTLSASVGDRIITC
 QASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGAEFTLTIS
 LQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLGGGGGSGGGGSGGGGSG
 GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTIDYYMTWVRQAPGKGLE
 WVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAG

GDHNSGWGLDIWGGTLVTVSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 77).

[00219] En otras formas de realización relacionadas, la o las variantes de AAV comprenden un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, por lo menos aproximadamente 99% idéntica o 100% idéntica a los aminoácidos 21-498 de la SEQ ID NO:77 (correspondiente a la secuencia de aminoácidos de Brolucizumab-Fc sin la secuencia señal peptídica subrayada).

[00220] En formas de realización particularmente preferidas, se provee un virión recombinante de AAV (rAAV) infeccioso que comprende una proteína variante de la cápside de AAV que comprende una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside en relación a la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental, en donde la inserción peptídica comprende la secuencia de aminoácidos ISDQTKH (SEQ ID NO:14) o LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) y un ácido nucleico heterólogo que codifica para un polipéptido que inhibe la actividad de VEGF, preferiblemente VEGFa, en donde la proteína variante de la cápside confiere infectividad aumentada de una célula de la retina en comparación con la infectividad de la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental para la célula de la retina. En algunas formas de realización, el sitio de inserción está entre los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 587 y 588 de VP1 de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV. Preferiblemente, la proteína variante de la cápside de AAV también comprende una sustitución de aminoácido P34A en relación a la cápside VP1 de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV.

[00221] En algunas formas de realización, se provee un virión de rAAV que comprende una proteína variante de la cápside de AAV que comprende (i) una inserción peptídica entre los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 587 y 588 de VP1 de AAV2 (SEQ ID NO:2), o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV de la proteína de la cápside en relación a la correspondiente

proteína de la cápside de AAV parental, y (ii) una sustitución de aminoácido P34A en relación a la cápside VP1 de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV, y un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia que codifica para Aflibercept. En formas de realización preferidas, la secuencia de ácido nucleico que codifica para Aflibercept consiste en o comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:65 o un ácido nucleico por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% idéntico a la misma. En una forma de realización particularmente preferida, se provee un virión de rAAV que comprende una proteína variante de la cápside de AAV que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica, por lo menos 95% idéntica o por lo menos 99% idéntica a la secuencia como se describe en la SEQ ID NO:42 y un ácido nucleico heterólogo que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:65, en donde la proteína variante de la cápside confiere infectividad aumentada de una célula de la retina en comparación con la infectividad de la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental para la célula de la retina. En otras formas de realización relacionadas, el ácido nucleico heterólogo además comprende una o más secuencias en donde cada una codifica para un inhibidor de VEGFa adicional preferiblemente seleccionado de Ranibizumab, sc-Ranibizumab HL, sc-Ranibizumab LH, sc-Ranibizumab-Fc, Brolucizumab, y Brolucizumab-Fc. En algunas formas de realización relacionadas, se provee una composición farmacéutica que comprende dicho rAAV. En otras formas de realización relacionadas, se provee un método para tratar una enfermedad ocular asociada con VEGFa que comprende la administración, a un sujeto que lo requiere, de una cantidad eficaz de un virión de rAAV que comprende una proteína variante de la cápside de AAV que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a la secuencia como se describe en la SEQ ID NO:42 y un ácido nucleico heterólogo que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:65 y opcionalmente una o más secuencias de ácido nucleico adicionales, en donde cada una codifica para un inhibidor de VEGFa diferente. El rAAV se puede administrar mediante una inyección subretinal, supracoroidea, tópica, intracameral o intravítrea, pero preferiblemente se administra por mediante una inyección intravítrea. En algunas formas de realización, la enfermedad ocular asociada con VEGFa se selecciona de degeneración macular relacionada con la edad (neovascular, exudativa) húmeda; edema macular posterior a oclusión de la vena

de la retina; neovascularización de la retina que resulta de la oclusión de la vena de la retina; edema macular diabético, retinopatía diabética (que incluye todas las etapas de la retinopatía diabética no proliferativa y retinopatía diabética proliferativa), degeneración macular miópica, oclusión de rama de la vena de la retina, oclusión de vena hemiretiniana, y oclusión de la vena central de la retina; retinopatía del prematuro; neovascularización idiopática coroidea; degeneración macular miópica y neovascularización secundaria de la retina y coroides; telangiectasia retiniana; glaucoma neovascular; hemorragia vítrea; neovascularización retiniana y coroidea secundaria a enfermedades de la retina, que incluye pero no se limita a uveítis, trauma, trastornos degenerativos de la retina, enfermedad genética de la retina y/o coroides, tumores del ojo, neovascularización de la córnea e iris. En algunas formas de realización preferidas, la enfermedad ocular asociada con VEGFa se selecciona de degeneración macular relacionada con la edad (neovascular, exudativa) húmeda; edema macular diabético; edema macular posterior a oclusión de la vena de la retina; retinopatía diabética; y neovascularización coroidea miópica.

[00222] En algunas formas de realización, se provee un virión de rAAV que comprende una proteína variante de la cápside de AAV que comprende (i) una inserción peptídica entre los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 587 y 588 de VP1 de AAV2 (SEQ ID NO:2), o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV de la proteína de la cápside en relación a la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental, y (ii) una sustitución de aminoácidos P34A en relación a la cápside VP1 de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV, y un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para Ranibizumab, sc-Ranibizumab HL, sc-Ranibizumab LH, o sc-Ranibizumab-Fc. En formas de realización preferidas, la secuencia de ácido nucleico que codifica para un sc-Ranibizumab consiste en o comprende la secuencia de ácido nucleico descrita en una cualquiera de las SEQ ID NOs: 67, 69, 70 y 72, o es por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% idéntica a la misma. En una forma de realización particularmente preferida, se provee un virión de rAAV que comprende una proteína variante de la cápside de AAV que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica, por lo menos 95% idéntica o por lo menos 99% idéntica a la secuencia como se describe en la SEQ ID NO:42 y un ácido nucleico

heterólogo que comprende la secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 67, 69, 70 y 72, en donde la proteína variante de la cápside confiere infectividad aumentada de una célula de la retina en comparación con la infectividad de la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental para la célula de la retina. En otras formas de realización relacionadas, el ácido nucleico heterólogo además comprende una o más secuencias de ácido nucleico adicionales en donde cada una codifica para un inhibidor de VEGFa diferente preferiblemente seleccionado de Aflibercept, Brolucizumab y Brolucizumab-Fc. En algunas formas de realización relacionadas, se provee una composición farmacéutica que comprende dicho rAAV. En otras formas de realización relacionadas, se provee un método para tratar una enfermedad ocular asociada con VEGFa intraocular elevado que comprende administrar a un sujeto que lo requiere, una cantidad eficaz de un virión de rAAV que comprende una proteína variante de la cápside de AAV que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a la secuencia como se describe en la SEQ ID NO:42 y un secuencia de ácido nucleico heterólogo que comprende la secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 67, 69, 70 y 72. Preferiblemente, el rAAV se administra mediante una inyección intravítrea. En algunas formas de realización, la enfermedad ocular asociada con VEGFa se selecciona de degeneración macular relacionada con la edad (neovascular, exudativa) húmeda; edema macular posterior a oclusión de la vena de la retina; neovascularización de la retina que resulta de la oclusión de la vena de la retina; edema macular diabético, retinopatía diabética (que incluye todas las etapas de la retinopatía diabética no proliferativa y retinopatía diabética proliferativa), degeneración macular miópica, oclusión de rama de la vena de la retina, oclusión de vena hemiretiniana, y oclusión de la vena central de la retina; retinopatía del prematuro; neovascularización idiopática coroidea; degeneración macular miópica y neovascularización secundaria de la retina y coroides; telangiectasia retiniana; glaucoma neovascular; hemorragia vítrea; neovascularización retiniana y coroidea secundaria a enfermedades de la retina, que incluye pero no se limita a uvetis, trauma, trastornos degenerativos de la retina, enfermedad genética de la retina y/o coroides, tumores del ojo, neovascularización de la córnea e iris. En algunas formas de realización preferidas, la enfermedad ocular asociada con VEGFa se selecciona de degeneración macular relacionada con la edad (neovascular, exudativa) húmeda; edema macular diabético; edema macular posterior a oclusión de la vena de la retina; retinopatía diabética; y neovascularización coroidea miópica.

[00223] En algunas formas de realización, se provee un virión de rAAV que comprende una proteína variante de la cápside de AAV que comprende (i) una inserción peptídica entre los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 587 y 588 de VP1 de AAV2 (SEQ ID NO:2), o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV de la proteína de la cápside en relación a la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental, y (ii) una sustitución de aminoácidos P34A en relación a la cápside VP1 de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV, y un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para Brolucizumab o Brolucizumab-Fc. En formas de realización preferidas, la secuencia de nucleótidos que codifica para Brolucizumab o Brolucizumab-Fc consiste en o comprende la secuencia de ácido nucleico descrita en SEQ ID NO:74 o SEQ ID NO:76 o es por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98%, o por lo menos aproximadamente 99% idéntica a la misma. En una forma de realización particularmente preferida, se provee un virión de rAAV que comprende una proteína variante de la cápside de AAV que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica, por lo menos 95% idéntica o por lo menos 99% idéntica a la secuencia como se describe en la SEQ ID NO:42 y un ácido nucleico heterólogo que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:74 o SEQ ID NO:76, en donde la proteína variante de la cápside confiere infectividad aumentada de una célula de la retina en comparación con la infectividad de la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental para la célula de la retina. En otras formas de realización relacionadas, el ácido nucleico heterólogo además comprende una o más secuencias nucleotídicas en donde cada una codifica para un inhibidor de VEGFa diferente preferiblemente seleccionado de Aflibercept, Ranibizumab, sc-Ranibizumab HL, sc-Ranibizumab LH, y sc-Ranibizumab-Fc. En algunas formas de realización relacionadas, se provee una composición farmacéutica que comprende dicho rAAV. En otras formas de realización relacionadas, se provee un método para tratar una enfermedad ocular asociada con VEGFa intraocular elevado que comprende administrar a un sujeto que lo requiere, una cantidad eficaz de un virión de rAAV que comprende una proteína variante de la cápside de AAV que tiene una secuencia de aminoácidos por lo menos 90% idéntica a la secuencia como se describe en la SEQ ID NO:42 y un secuencia de ácido nucleico heterólogo que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:74 o SEQ

ID NO:76. Preferiblemente, el rAAV se administra mediante una inyección intravítrea. En algunas formas de realización, la enfermedad ocular asociada con VEGFa se selecciona de degeneración macular relacionada con la edad (neovascular, exudativa) húmeda; edema macular posterior a oclusión de la vena de la retina; neovascularización de la retina que resulta de la oclusión de la vena de la retina; edema macular diabético, retinopatía diabética (que incluye todas las etapas de la retinopatía diabética no proliferativa y retinopatía diabética proliferativa), degeneración macular miópica, oclusión de rama de la vena de la retina, oclusión de vena hemiretiniana, y oclusión de la vena central de la retina; retinopatía del prematuro; neovascularización idiopática coroidea; degeneración macular miópica y neovascularización secundaria de la retina y coroides; telangiectasia retiniana; glaucoma neovascular; hemorragia vítrea; neovascularización retiniana y coroidea secundaria a enfermedades de la retina, que incluye pero no se limita a uvetis, trauma, trastornos degenerativos de la retina, enfermedad genética de la retina y/o coroides, tumores del ojo, neovascularización de la córnea e iris. En algunas formas de realización preferidas, la enfermedad ocular asociada con VEGFa se selecciona de degeneración macular relacionada con la edad (neovascular, exudativa) húmeda; edema macular diabético; edema macular posterior a oclusión de la vena de la retina; retinopatía diabética; y neovascularización coroidea miópica.

[00224] Los genes cuyos productos génicos funcionan como moduladores inmunológicos, por ejemplo, factores de complemento, receptores similares a toll, se llaman “genes inmunomoduladores”. Los ejemplos de genes inmunomoduladores incluyen citoquinas, quimoquinas, y las proteínas de fusión o anticuerpos que son específicos para los mismos y/o sus receptores, por ejemplo la proteína de fusión anti-IL-6 RilonaceptTM, el anticuerpo específico anti-Factor de Complemento H lampamizumab, etc. Los genes cuyos productos génicos funcionan como factores neuroprotectores, por ejemplo, son el receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR); factor neurotrófico derivado de células gliales (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 neural (NGF); neurotrofina-4 (NT4); factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF); factor de crecimiento epidérmico. Los genes cuyos productos génicos funcionan como opsinas de respuesta leve, por ejemplo, son opsina; rodopsina; rodopsina de canal; halo rodopsina.

[00225] En algunos casos, un producto génico de interés es una endonucleasa específica de sitio que provee el silenciamiento específico de sitio de la función génica, por ejemplo, cuando la endonucleasa noquea un alelo asociado con una enfermedad de la retina. Por ejemplo, cuando un alelo dominante codifica para una copia defectuosa de un gen que, cuando es de tipo salvaje, es una proteína estructural de la retina y/o provee una función normal de la retina, se puede dirigir una endonucleasa específica de sitio contra el alelo defectuoso y noquear el alelo defectuoso.

[00226] Además de noquear un alelo defectuoso, también se puede usar una nucleasa específica de sitio para estimular la recombinación homóloga con un ADN donante que codifica para una copia funcional de la proteína codificada por el alelo defectuoso. Por lo tanto, por ejemplo, se puede usar un virión de rAAV de la presente para administrar tanto una endonucleasa específica de sitio que noquea un alelo defectuoso, como para administrar una copia funcional del alelo defectuoso, resultando en la reparación del alelo defectuoso, suministrando así la producción de una proteína funcional de la retina (por ejemplo, retinosquisina funcional, RPE65 funcional, periférica funcional, etc.). Véase, por ejemplo, Li y col. (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 para una endonucleasa específica de sitio; y una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica para una copia funcional de un alelo defectuoso, en donde la copia funcional codifica para una proteína funcional de la retina. Las proteínas funcionales de la retina incluyen, por ejemplo, retinosquisina, RPE65, proteína 1 de interacción con el regulador de GTPasa de retinitis pigmentosa (RGPR), periférica, periférica-2, y similares.

[00227] Las endonucleasas específicas de sitio que son útiles para usar incluyen, por ejemplo, meganucleasas; nucleasas de dedos de cinc (ZFN); nucleasas efectoras similares a activador de la transcripción (TALEN); y repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interespaciadas/proteína asociada a CRISPR (Cas), en donde dichas endonucleasas específicas de sitio no son de origen natural y están modificadas para direccionarse contra un gen específico. Dichas nucleasas específicas de sitio pueden manipularse para cortar en localizaciones específicas dentro de un genoma, y la asociación de extremos no homólogos puede entonces reparar la rotura a la vez que inserta o elimina varios nucleótidos. Dichas endonucleasas específicas de sitio (también denominadas “INDEL”) colocan entonces

a la proteína fuera del marco de lectura y noquean eficazmente el gen. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de los EE.UU. No. 2011/0301073.

[00228] En algunas formas de realización del vector de rAAV variante divulgado en la presente, una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto génico de interés está ligada operativamente a un promotor constitutivo. Los promotores constitutivos adecuados incluyen por ejemplo el promotor de citomegalovirus (CMV) (Stinski y col. (1985) *Journal de Virology* 55(2): 431-441), potenciador temprano de CMV /promotor de β -actina de pollo (CBA) /intrón de β -globina de conejo (CAG) (Miyazaki y col. (1989) *Gene* 79(2): 269-277, CB^{SB} (Jacobson y col. (2006) *Molecular Therapy* 13(6): 1074-1084), promotor 1 α de factor de elongación humano (EF1 α) (Kim y col. (1990) *Gene* 91(2): 217-223), promotor de fosfoglicerato quinasa humana (PGK) (Singer-Sam y col. (1984) *Gene* 32(3): 409-417, promotor de hebra pesada mitocondrial (Loderio y col. (2012) *PNAS* 109(17): 6513-6518), promotor de ubiquitina (Wulff y col. (1990) *FEBS Letters* 261: 101-105). En otras formas de realización, una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto génico de interés está ligada operativamente a un promotor inducible. En algunos casos, una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto génico de interés está ligada operativamente a un elemento regulador específico de tejido o específico de tipo celular. Por ejemplo, en algunos casos, una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto génico de interés está ligada operativamente a un elemento regulador específico de fotorreceptores (por ejemplo, un promotor específico de fotorreceptores), por ejemplo, un elemento regulador que confiere expresión selectiva del gen ligado en forma operativa en una célula fotorreceptora. Los elementos reguladores adecuados específicos de fotorreceptores incluyen, por ejemplo, un promotor de rodopsina; un promotor de rodopsina quinasa (Young y col. (2003) *Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:4076); un promotor del gen fosfodiesterasa beta (Nicoud y col. (2007) *J. Gene Med.* 9:1015); un promotor del gen de retinitis pigmentosa (Nicoud y col. (2007) *supra*); un potenciador del gen de la proteína de unión a retinoide interfotorreceptor (IRBP) (Nicoud y col. (2007) *supra*); un promotor del gen IRBP (Yokoyama y col. (1992) *Exp Eye Res.* 55:225), un promotor del gen de opsina (Tucker y col. (1994) *PNAS* 91:2611-2615), un promotor del gen de retinosquisina (Park y col. (2009) *Gene Therapy* 16(7): 916-926), un promotor del gen de la proteína de homeodominio CRX (Furukawa y col. (2002) *The Journal of Neuroscience* 22(5): 1640-1647), un promotor del gen del polipéptido 1 de actividad de transducción de proteína alfa de unión a nucleótido de

guanina (GNAT1) (Lee y col. (2010) *Gene Therapy* 17:1390-1399), un promotor del gen de la proteína de cremallera de leucina específica de la retina neural (NRL) (Akimoto y col. (2006) *PNAS* 103(10): 3890-3895), promotor de arrestina de cono humana (hCAR) (Li y col. (2002) *Biochemistry and Molecular Biology* 43: 1375-1383), y los promotores PR2.1, PR1.7, PR1.5, y PR1.1 (Ye y col. (2016) *Human Gene Therapy* 27(1): 72-82)). En algunos casos, una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto génico de interés está ligada operativamente a un elemento regulador específico de células 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 ligado en forma operativa en una célula RPE. Los elementos reguladores adecuados específicos de RPE incluyen, por ejemplo, un promotor del gen de RPE65 (Meur y col. (2007) *Gene Therapy* 14: 292-303), un promotor del gen de la proteína de unión a retinaldehído celular (CRALBP) (Kennedy y col. (1998) *Journal of Biological Chemistry* 273: 5591-5598), un promotor del gen del factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF aka serpina F1) (Kojima y col. (2006) *Molecular and Cellular Biochemistry* 293(1-2): 63-69), y un promotor de distrofia macular viteliforme (VMD2) (Esumi y col. (2004) *The Journal of Biological Chemistry* 279(18): 19064-19073). En algunos casos, una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto génico de interés está ligada operativamente a un elemento regulador específico de células gliales de Müller (por ejemplo, un promotor específico glial), por ejemplo, un elemento regulador que confiere expresión selectiva del gen ligado en forma operativa en una célula de la glía de la retina. Los elementos reguladores adecuados específicos de células gliales incluyen, por ejemplo, un promotor de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (Besnard y col. (1991) *Journal of Biological Chemistry* 266(28): 18877-18883). En algunos casos, una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto génico de interés está ligada operativamente a un elemento regulador específico de células bipolares (por ejemplo, un promotor específico bipolar), por ejemplo, un elemento regulador que confiere expresión selectiva del gen ligado en forma operativa en una célula bipolar. Los elementos reguladores adecuados específicos de células bipolares incluyen, por ejemplo, un promotor de GRM6 (Cronin y col. (2014) *EMBO Molecular Medicine* 6(9): 1175-1190).

[00229] Para los propósitos de la invención, la divulgación de la presente provee un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína variante de la cápside de AAV como se describió

previamente. Un ácido nucleico aislado puede ser un vector AAV, por ejemplo, un vector AAV recombinante.

[00230] La divulgación de la presente también provee 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 describió y divulgó anteriormente en la presente. Los expertos en la materia serán capaces de determinar con facilidad una cantidad eficaz del virión de rAAV de la presente, y que la enfermedad se ha tratado, mediante la prueba de un cambio en uno o más parámetros anatómicos o funcionales, por ejemplo agudeza visual, campo visual, respuesta electrofisiológica a la luz y la oscuridad, visión de colores, sensibilidad al contraste, anatomía, salud y vasculatura de la retina, motilidad ocular, preferencia de fijación, y estabilidad.

[00231] Los métodos no limitantes para evaluar la función de la retina y los cambios de la misma incluyen evaluar la agudeza visual (por ejemplo la agudeza visual mejor corregida [BCVA], ambulación, navegación, detección y discriminación de objetos), evaluar el campo visual (por ejemplo campo visual perimétrico estático y cinético), llevar a cabo 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 luz y oscuridad (por ejemplo todas las formas de electroretinografía (ERG) [de campo completo, multifocal y de patrones], todas las formas de potencial evocado visual (VEP), electrooculografía (EOG), visión en colores, adaptación a la oscuridad y/o sensibilidad al contraste). Los métodos no limitantes para evaluar la anatomía y salud de la retina y los cambios de la misma incluyen Tomografía de Coherencia Óptica (OCT), fotografía de fondo, oftalmología láser de barrido óptico adaptativo (AO-SLO), fluorescencia y/o autofluorescencia; medir la motilidad ocular y movimiento de los ojos (por ejemplo nistagmo, preferencia de fijación, y estabilidad), medir los resultados informados (cambios informados por el paciente en comportamientos y actividades guiadas visuales y no visuales, resultados informados por el paciente [PRO], evaluaciones basadas en cuestionarios de calidad de vida, actividades diarias y medidas de función neurológica (por ejemplo Imágenes de Resonancia Magnética (MRI) funcional).

[00232] En algunas formas de realización, una cantidad eficaz del virión de rAAV de la presente resulta en una disminución de la tasa de pérdida de función de la retina, integridad anatómica, o salud de la retina, por ejemplo una disminución de 2

veces, 3 veces, 4 veces, o 5 veces o más en la tasa de pérdida y por lo tanto en la progresión de la enfermedad, por ejemplo, una disminución de 10 veces o más en la tasa de pérdida y por lo tanto en la progresión de la enfermedad. En algunas formas de realización, la cantidad eficaz del virión de rAAV de la presente resulta en una ganancia de la función visual, función de la retina, una mejora en la anatomía o la salud de la retina, y/o una mejora de la motilidad ocular y/o mejora de la función neurológica, por ejemplo una mejora de 2 veces, 3 veces, 4 veces o 5 veces o más de la función de la retina, anatomía o salud de la retina, y/o de mejora de motilidad ocular, por ejemplo una mejora de 10 veces o más de la función de la retina, anatomía o salud de la retina, y/o de mejora de motilidad ocular. Como será fácilmente apreciado por los expertos en la materia, la dosis que se requiere para conseguir el efecto de tratamiento deseado estará habitualmente en el rango entre 1×10^8 y aproximadamente 1×10^{15} viriones recombinantes, habitualmente mencionado por los expertos en la materia como entre 1×10^8 y aproximadamente 1×10^{15} “genomas de vector”.

[00233] Un virión de rAAV de la presente se puede administrar a través de inyección intraocular, por ejemplo por inyección intravítrea, por inyección subretinal, por inyección supracoroidea, o por cualquier otro modo o ruta de administración conveniente que resulte en la administración del virión de rAAV al ojo. Otras prácticas o rutas de administración convenientes incluyen, sin limitación, inyecciones intravenosas, intraarteriales, perioculares, intracamerales, subconjuntivales y subtenonianas y administración tópica e intranasal. Cuando se administra a través de inyección intravítrea, el virión de rAAV de la presente es capaz de moverse a lo largo del cuerpo vítreo y atravesar la membrana limitante interna (también llamada en la presente como membrana limitante interior, o “ILM”; una membrana delgada, transparente acelular sobre la superficie de la retina que forma el límite entre la retina y el cuerpo vítreo, formado por astrocitos y el pie extremo de las células de Müller), y/o se mueve a través de las capas de la retina más eficazmente, en comparación con la capacidad de un virión de AAV que comprende la correspondiente proteína de la cápside del AAV parental.

[00234] Una proteína variante de la cápside como se divulga en la presente está aislada, por ejemplo, purificada. En algunas formas de realización, una proteína variante de la cápside como se divulga en la presente está incluida en un vector AAV o un virión de AAV recombinante (rAAV). En otras formas de realización, dichos

vectores de AAV variantes y/o viriones variantes de AAV se usan en un método *in vivo* o *ex vivo* para tratar la enfermedad ocular en la retina de primate.

[00235] La presente divulgación además provee células huéspedes tales como, sin limitación, células huéspedes aisladas (genéticamente modificadas) que comprenden un ácido nucleico de la presente. Una célula huésped de acuerdo con la invención que se divulga en la presente puede ser una célula aislada, tal como una célula de un cultivo celular *in vitro*. Dicha célula huésped es útil para producir un virión de variante rAAV de la presente, como se describió en la presente. En una forma de realización, dicha célula huésped esta genéticamente modificada en forma estable con un ácido nucleico. En otras formas de realización, una célula huésped está genéticamente modificada en forma transitoria con un ácido nucleico. Dicho ácido nucleico se introduce en forma estable o transitoria en una célula huésped, usando técnicas establecidas, incluyendo, a título enunciativo no taxativo, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por liposomas, y similares. Para la transformación estable, en general un ácido nucleico además incluirá un marcador de selección, por ejemplo, cualquiera de los varios marcadores de selección bien conocidos tales como resistencia a neomicina, y similares. Dicha célula huésped se genera mediante la introducción de un ácido nucleico en cualquiera de una variedad de células, por ejemplo, células de mamífero, incluyendo, por ejemplo, células murinas, y células de primate (por ejemplo, células humanas). Los ejemplos de células de mamífero incluyen, a título enunciativo no taxativo, células primarias y líneas celulares, en donde los ejemplos de líneas celulares incluyen, a título enunciativo no taxativo, células 293, células COS, células HeLa, células Vero, fibroblastos de ratón 3T3, fibroblastos C3H10T1/2, células CHO, y similares. Los ejemplos de células huéspedes incluyen, sin limitación, células HeLa (por ejemplo, American Type Culture Collection (ATCC) No. CCL-2), células CHO (por ejemplo, ATCC Nos. CRL9618, CCL61, CRL9096), células 293 (por ejemplo, ATCC No. CRL-1573), células Vero, células NIH 3T3 (por ejemplo, ATCC No. CRL-1658), células Huh-7, células BHK (por ejemplo, ATCC No. CCL10), células PC12 (ATCC No. CRL1721), células COS, células COS-7 (ATCC No. CRL1651), células RAT1, células L de ratón (ATCC No. CCLI.3), células de riñón de embrión humano (HEK) (ATCC No. CRL1573), células HLHepG2, y similares. También se puede elaborar una célula huésped usando un baculovirus para infectar células de insecto tales como células Sf9, que producen el AAV (véase, por ejemplo, Patente de los EE. UU. No. 7.271.002; Solicitud de Patente de los EE.UU.

Ser. No. 12/297,958). En algunas formas de realización, una célula huésped genéticamente modificada incluye, además de un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una variante de proteína de la cápside de AAV, como se describió anteriormente, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una o más proteínas rep de AAV. En otras formas de realización, una célula huésped además comprende un vector de rAAV variante. Se puede generar un virión de rAAV variante usando dichas células huéspedes. Los métodos para generar un virión de rAAV se describen, por ejemplo, en la Publicación de Patente de los EE.UU. No. 2005/0053922 y la Publicación de Patente de los EE.UU. No. 2009/0202490.

[00236] La divulgación de la presente además provee una composición farmacéutica que comprende: a) el virión de rAAV variante, como se describió y se divulgó anteriormente en la presente; y b) un vehículo, diluyente, excipiente o solución amortiguadora farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el vehículo, diluyente, excipiente o solución amortiguadora farmacéuticamente aceptable es adecuada para usar en un paciente humano o no humano. Dichos excipientes, vehículos, diluyentes, y soluciones amortiguadoras incluyen cualquier agente farmacéutico que se pueda administrar sin una toxicidad manifiesta. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, a título enunciativo no taxativo, líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. En la presente se pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables, 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 puede haber presente cualquier sustancia auxiliar, tal como agentes humectantes o emulsionantes, tensioactivos, sustancias amortiguadoras del pH, y similares. Se conoce una amplia variedad de excipientes farmacéuticamente aceptables en la materia y no necesitan discutirse en forma detallada en la presente. Los excipientes farmacéuticamente aceptables se han descrito en forma amplia en una variedad de publicaciones, incluyendo, por ejemplo, A. Gennaro (2000) “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, 20ma edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel y col., eds., 7^{ma} ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; y Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe y col., eds., 3^{ra} ed. Amer. Pharmaceutical Assoc. En algunos aspectos de la presente invención, la presente invención provee una

composición farmacéutica que comprende entre aproximadamente 1×10^8 y aproximadamente 1×10^{15} virus recombinantes o entre 1×10^8 y aproximadamente 1×10^{15} genomas de vector, en donde cada uno de dichos virus recombinantes comprende un genoma que codifica para uno o más productos génicos.

[00237] Algunas formas de realización de la invención se ejemplifican en los siguientes ítems 1 a 36:

1. Una proteína variante de la cápside de un virus adenoasociado (AAV) que comprende una inserción peptídica en el bucle GH de la proteína de la cápside en relación a la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental, en donde la inserción peptídica comprende la secuencia de aminoácidos ISDQTKH (SEQ ID NO:14), y en donde la proteína variante de la cápside confiere infectividad aumentada de una célula de la retina en comparación con la infectividad de la correspondiente proteína de la cápside de AAV parental para la célula de la retina.

2. La proteína variante de la cápside de AAV del ítem 1, en donde la inserción peptídica comprende la secuencia de aminoácidos $Y_1Y_2ISDQTKHY_3$, en donde cada uno de Y_1 - Y_3 se selecciona de manera independiente de Ala, Leu, Gly, Ser, Thr y Pro.

3. La proteína variante de la cápside de AAV del ítem 2, en donde la inserción peptídica comprende la secuencia de aminoácidos LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28).

4. La proteína variante de la cápside de AAV de uno cualquiera de los ítems 1-3, en donde el sitio de inserción está entre los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 587 y 588 de VP1 de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de AAV.

5. La proteína variante de la cápside de AAV de uno cualquiera de los ítems 1-4, en donde la proteína de la cápside comprende una o más sustituciones de aminoácido relacionadas con la cápside VP1 de AAV2 (SEQ ID NO:2) o una o más sustituciones correspondientes en otro serotipo de AAV.

6. La proteína variante de la cápside de AAV de uno cualquiera de los ítems 1-5, en donde la proteína de la cápside comprende una sustitución de aminoácido P34A en relación a la cápside VP1 de AAV2 (SEQ ID NO:2) o la correspondiente sustitución en otro serotipo de AAV.

7. La proteína variante de la cápside de AAV de uno cualquiera de los ítems 1-6, en donde la proteína de la cápside comprende (i) la secuencia de aminoácidos ISDQTKH (SEQ ID NO:14) y (ii) una sustitución de aminoácidos P34A, y que es por lo menos 90% idéntica, por lo menos 95% idéntica o por lo menos 99% idéntica a la secuencia como se describe en la SEQ ID NO:42.
8. La proteína variante de la cápside de AAV del ítem 7, en donde la proteína de la cápside consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:42.
9. Un virión recombinante de AAV (rAAV) que comprende una proteína variante de la cápside de AAV de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 1-8 y un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un producto génico.
10. El rAAV del ítem 9, en donde el producto génico es un polipéptido.
11. El rAAV del ítem 10, en donde el ácido nucleico heterólogo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido que inhibe la actividad del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).
12. El rAAV del ítem 11, en donde la secuencia de nucleótidos codifica para una proteína de fusión.
13. El rAAV del ítem 12, en donde la secuencia de nucleótidos codifica para Afibercept (Eylea).
14. El rAAV del ítem 13, en donde la secuencia de nucleótidos es por lo menos 90% idéntica, por lo menos 95% idéntica o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de ácido nucleico como se describe en la SEQ ID NO: 65 o a los nucleótidos 79-1377 de la SEQ ID NO:65 y preferiblemente codifica para la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:66 o aminoácidos 27-458 de la SEQ ID NO:66.
15. El rAAV del ítem 11, en donde la secuencia de nucleótidos codifica para un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo.
16. El rAAV del ítem 15, en donde la secuencia de nucleótidos codifica para Ranibizumab (Lucentis).

17. El rAAV del ítem 15, en donde la secuencia de nucleótidos (i) comprende a secuencia por lo menos 90% idéntica, por lo menos 95% idéntica o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO:67 (sc-Ranibizumab HL) o a los nucleótidos 58-1575 de la SEQ ID NO:67 y codifica para la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:68 o (ii) codifica para la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 20-524 de la SEQ ID NO:68.

18. El rAAV del ítem 15, en donde la secuencia de nucleótidos (i) tiene una secuencia por lo menos 90% idéntica, por lo menos 95% idéntica o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO:69 (sc-Ranibizumab LH1) o SEQ ID NO:70 (sc-Ranibizumab LH2) o a los nucleótidos 61-1578 de la SEQ ID NO:69 o SEQ ID NO:70 y codifica para la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:71 o (ii) codifica para la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 21-525 de la SEQ ID NO:71.

19. El rAAV del ítem 15, en donde la secuencia de nucleótidos (i) tiene una secuencia por lo menos 90% idéntica, por lo menos 95% idéntica o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO:72 (sc-Ranibizumab-Fc) o a los nucleótidos 61-2277 de la SEQ ID NO:72 y codifica para la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:73 o (ii) codifica para la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 21-752 de la SEQ ID NO:73.

20. El rAAV del ítem 15, en donde la secuencia de nucleótidos codifica para Brolucizumab.

21. El rAAV del ítem 20, en donde la secuencia de nucleótidos tiene una secuencia por lo menos 90% idéntica, por lo menos 95% idéntica o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de ácido nucleico como se describe en la SEQ ID NO:74 o a los nucleótidos 61-816 de la SEQ ID NO:74 y preferiblemente codifica para la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:75 o la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 21-271 de la SEQ ID NO:75.

22. El rAAV del ítem 15, en donde la secuencia de nucleótidos (i) tiene una secuencia por lo menos 90% idéntica, por lo menos 95% idéntica o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de la SEQ ID NO:76 (Brolucizumab-Fc) o a los nucleótidos 61-1530 de la SEQ ID NO:76 y codifica para la secuencia de aminoácidos

como se describe en la SEQ ID NO:77 o (ii) codifica para la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 21-498 de la SEQ ID NO:77.

23. El rAAV del ítem 11, en donde el ácido nucleico heterólogo comprende (i) una secuencia que codifica para Aflibercept, en donde preferiblemente la secuencia que codifica para aflibercept es por lo menos 90% idéntica, por lo menos 95% idéntica o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de ácido nucleico como se describe en la SEQ ID NO: 65 y codifica para la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:66 y (ii) una secuencia que codifica para Brolucizumab, en donde preferiblemente la secuencia que codifica para Brolucizumab es por lo menos 90% idéntica, por lo menos 95% idéntica o por lo menos 99% idéntica a la secuencia de ácido nucleico como se describe en la SEQ ID NO: 74 o SEQ ID NO:76 y preferiblemente codifica para la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:75 o SEQ ID NO:77.

24. El rAAV de uno cualquiera de los ítems 9-23, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica para un producto génico está ligada operativamente a una secuencia de control de la expresión.

25. Una composición farmacéutica que comprende un rAAV de acuerdo con cualquiera de los ítems 11-24 y un transportador farmacéuticamente aceptable.

26. Un método para administrar un inhibidor de VEGF a una célula de la retina, célula coroidea, célula lenticular, célula ciliar, célula del iris, célula del nervio óptico y/o célula de la córnea en un sujeto que comprende administrar al sujeto un virión de rAAV de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 11-24 o una composición farmacéutica de acuerdo con ítem 24.

27. El método del ítem 26, en donde el virión de rAAV o la composición farmacéutica se administra al sujeto por vía intravítrea.

28. Un método para tratar una enfermedad ocular asociada con VEGFa seleccionada de degeneración macular relacionada con la edad (neovascular, exudativa) húmeda; edema macular posterior a oclusión de la vena de la retina; neovascularización de la retina que resulta de la oclusión de la vena de la retina; edema macular diabético, retinopatía diabética (que incluye todas las etapas de la retinopatía diabética no proliferativa y retinopatía diabética proliferativa); degeneración macular miópica; oclusión de rama de la vena de la retina, oclusión de

vena hemiretiniana, y oclusión de la vena central de la retina; retinopatía del prematuro; neovascularización idiopática coroidea; degeneración macular miópica y neovascularización secundaria de la retina y coroides; telangiectasia retiniana; glaucoma neovascular; hemorragia vítrea; neovascularización retiniana y coroidea secundaria a enfermedades de la retina, que incluye pero no se limita a uvetis, trauma, trastornos degenerativos de la retina, enfermedad genética de la retina y/o coroides, tumores del ojo, neovascularización de la córnea e iris en un sujeto que requiere dicho tratamiento mediante la administración de una cantidad eficaz de un rAAV de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 11-24 o una composición farmacéutica de acuerdo con el ítem 25.

29. El método del ítem 28, en donde la enfermedad ocular asociada con VEGFa se selecciona de degeneración macular relacionada con la edad (neovascular, exudativa) húmeda; edema macular diabético; edema macular posterior a oclusión de la vena de la retina; retinopatía diabética; y neovascularización coroidea miópica.

30. El método de uno cualquiera de los ítems 26 a 29, en donde el rAAV comprende una proteína de la cápside que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:42 y un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia que codifica para Aflibercept, en donde preferiblemente la secuencia que codifica para Aflibercept tiene la secuencia descrita en SEQ ID NO:65.

31. El método de uno cualquiera de los ítems 26 a 29, en donde el rAAV comprende una proteína de la cápside que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:42 y un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia que codifica para Ranibizumab, sc-Ranibizumab HL, sc-Ranibizumab LH, o sc-Ranibizumab-Fc, en donde preferiblemente la secuencia que codifica para sc-Ranibizumab HL, sc-Ranibizumab LH, o sc-Ranibizumab-Fc tiene la secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NOs:67, 69, 70 y 72.

32. El método de uno cualquiera de los ítems 26 a 29, en donde el rAAV comprende una proteína de la cápside que consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:42 y un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia que codifica para brolicizumab o brolicizumab-Fc, en

donde preferiblemente la secuencia que codifica para brolicizumab o brolicizumab-Fc tiene la secuencia descrita en SEQ ID NO:74 o SEQ ID NO:76.

33. El método de uno cualquiera de los ítems 28-32, en donde el rAAV o la composición farmacéutica se administra al sujeto por vía intravítrea.

34. El método de uno cualquiera de los ítems 26-33, en donde el sujeto es un humano.

35. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína variante de la cápside de AAV de acuerdo con uno cualquiera de los ítems 1-8.

36. Una célula huésped aislada, modificada genéticamente que comprende el ácido nucleico del ítem 35.

EJEMPLOS

[00238] Los siguientes ejemplos se establecen para proveerle a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de la manera para elaborar y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de aquello que los inventores consideran su invención, ni pretenden representar que los experimentos siguientes son la totalidad o los únicos experimentos llevados a cabo. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números que se usaron (por ejemplo cantidades, temperatura, etc.) pero se deben tener en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular ponderado en peso, la temperatura está en grados centígrados, y la presión es la atmosférica, o un valor cercano a la misma.

[00239] Los métodos generales de bioquímica molecular y celular se pueden hallar en libros de texto estándares tales como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ra Ed. (Sambrook y col., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4ta Ed. (Ausubel y col. eds., John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag y col., John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner y col. eds., Academic Press 1999); Viral Vectors (Kapliff & 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 a la presente a modo de referencia. Los reactivos, vectores de clonado, y kits de manipulación

genética a los que se hace referencia en esta divulgación están disponibles a partir de vendedores comerciales tales como BioRad, Stratagene, Invitrogen, Sigma-Aldrich, y ClonTech.

[00240] Ejemplo 1

[00241] Inyección Intravítrea y Recolección de Tejido. Se dosificó un macho individual de macaco cinomolgo (*macaca fascicularis*) de entre 4 y 10 años de edad y con un peso de por lo menos 4 kg mediante inyección intravítrea a través de la esclerótica (aproximadamente 3 mm detrás del limbo usando un procedimiento y dispositivo de administración adecuado para uso humano). Se anestesió el animal y se le suministró anestesia tópica. Se administraron 100 µL de la biblioteca en cada ojo.

[00242] Se llevó a cabo el sacrificio mediante personal veterinario entrenado usando una inyección de 100 mg/kg de pentobarbital sódico intravenoso en el día 14±3. Se enuclearon los ojos y se almacenaron a 4°C hasta su disección.

[00243] Disección del Tejido. Se cortaron los ojos a lo largo de la ora serrata con escalpelo, y se quitó el segmento anterior. Se hicieron cortes de aligeramiento en la retina alrededor de la fovea para permitir el montaje plano de la retina, y se extrajo el cuerpo vítreo. Se recolectaron seis muestras de la retina de cada cuadrante (superior, inferior, nasal, y temporal), como se muestra en la **Figura 2**, y se aisló el material celular correspondiente a las células RPE, fotorreceptores, células bipolares, células amácrinas, células horizontales, y/o células ganglionares.

[00244] Evolución Dirigida. El proceso de evolución dirigida se muestra en la Figura 1A-1E. En resumen, se crea una biblioteca de cápsides virales que comprende 20+ combinaciones de técnicas de mutación de ADN y genes *cap* (**Figura 1A**). Luego se empaquetan los virus (**Figura 1B**) — de manera que cada partícula esté compuesta por una cápside mutante que rodea al gen *cap* que codifica para esa cápside — y se purifica. La biblioteca de cápsides se coloca bajo presión de selección *in vivo*. Se recolecta el tejido o material celular de interés para aislar las variantes de AAV que han infectado exitosamente esa diana, y se recuperan los virus exitosos. Se enriquecen los clones exitosos a través de selección repetitiva (Etapa I – **Figura 1D**). Los genes *cap* seleccionados se someten entonces a una rediversificación patentada y se enriquecen a través de pasos de selección adicionales para incrementar en forma iterativa la aptitud del virus (Etapa 2 – **Figura 1D**). Las variantes identificadas durante las Etapas de Selección de Vectores 1 y 2 demuestran capacidad para transducir las células de la retina de primate (**Figura 1E**).

[00245] Recuperación Exitosa de Genomas de Cápside de AAV: Rondas 1-6. Las cápsides recuperadas de cada ronda de selección se usaron para empaquetar la biblioteca inyectada para iniciar la subsiguiente ronda de selección. La recuperación de los genes de cápside a partir del tejido representa la internalización exitosa de los vectores de la biblioteca dentro del tejido de interés. Después de la Ronda 4, se incorporó una rediversificación adicional de la biblioteca antes del empaquetamiento de la biblioteca y la inyección para la Ronda 5. La recuperación de los genomas virales de tejido de retina de RPE, PR, capa nuclear interna (INL), y capa de células ganglionares (GCL) de una ronda de selección representativa se muestra en la Figura 3. Las bandas dentro de las cajas representan la recuperación exitosa de los genomas virales.

[00246] Análisis de Secuenciación: Rondas 3-6. Durante las rondas 3-6, se llevó a cabo la secuenciación de los clones individuales dentro de la biblioteca para determinar la frecuencia de variantes dentro de la población. Se evaluaron las variantes estudiando la presencia de motivos dentro de los datos de secuenciación. Se agruparon las variantes en motivos en base a la presencia de una variación unificadora (por ejemplo, una secuencia de mutación puntual específica o una inserción peptídica específica en una localización consistente dentro de la cápside) que haya ocurrido en múltiples secuencias. Los motivos que representan por lo menos 5% de la población secuenciada en dos o más rondas de la selección o por lo menos 10% de la población secuenciada en una o más rondas de la selección, se representan en la Figura 4A (Ronda 3 análisis de secuenciación), 4B (Ronda 4 análisis de secuenciación), 4C (Ronda 5 análisis de secuenciación), y 4D (Ronda 6 análisis de secuenciación).

[00247] Se identificaron varios clones representativos que conferían infectividad aumentada en las células de la retina, los cuales se presentan en la Tabla 1 siguiente (cada clon contiene la o las sustituciones y/o inserción peptídica indicadas y, por lo demás, es idéntica a la SEQ ID NO:2; se presenta para cada clon la ronda de selección, el número de secuencias y la frecuencia (entre paréntesis)):

Tabla 1. Modificaciones de la secuencia de aminoácidos a la proteína de la cápside VP1 de AAV que confieren infectividad aumentada en una o más células de la retina. Las sustituciones que se presentan en la columna 2 se basan en la secuencia de aminoácidos para AAV2 de tipo salvaje, es decir en ausencia de péptido insertado.

Inserción	Sustitución	Pan- Retinal	RPE	Fotorrec eptor
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%)	

Inserción	Sustitución	Pan- Retinal	RPE	Fotorrec eptor
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%)		
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+N 551S+I698V+L73 5Q	Modificada		Modifica do
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%)		

Inserción	Sustitución	Pan- Retinal	RPE	Fotorrec eptor
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		

Inserción	Sustitución	Pan- Retinal	RPE	Fotorrec eptor
		1 (1,85%) 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%)		

Inserción	Sustitución	Pan- Retinal	RPE	Fotorrec eptor
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 +A593E+V708I	Ronda 3 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%)	Rondas 3, 4, 5 12 (25%)	Ronda 4 1 (2,17%)

Inserción	Sustitución	Pan- Retinal	RPE	Fotorrec eptor
		7 (9,33%) 1 (1,89%)	7 (15,9%) 14(31,8%)	
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, 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%)

[00248] También se identificó como una cápside con infectividad aumentada, en una o más células de la retina, a un clon con la siguiente secuencia ancestral de cápside de VP1:

[00249] MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQ
DDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNP
YLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAP
GKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPPLGEP
AGPSGLGSGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRTVIT
STRTWALPTYNNHLYKQISSASAGSTNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSP
RDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNDGVTTIANNLTSTVQVFSD
SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYF
PSQMLRTGNNFTFSYTFEDVFPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLYYLARTQST
GGTAGTRELLFSQAGPSNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSKTLSQNNNSNFAW
TGATKYHLNGRDSL VNPGVAMATHKDDERFFPSSGVLIFGKQGAGANNTA
LENNMMTSEEEIKTTNPVATEQYGVVASNLQSSNTAPVTGTVNSQGALPGM
VWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTVPANP
PAVFTPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYAKSTNV
DFAVDNEG VYSEPRPIGTRYLTRNL. (SEQ ID NO:59)

[00250] Esta variante de cápside ancestral evolucionó 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.

[00251] Los viriones variantes de AAV divulgados en la presente pueden incorporar parámetros de diseño racionales y razonables, características, modificaciones, ventajas, y variaciones que son fácilmente evidentes para los expertos en la materia en el campo de la manipulación de vectores virales de AAV.

[00252] Ejemplo 2

[00253] Se empleó una evolución dirigida para descubrir nuevas variantes de virus adenoasociados (AAV) con administración superior de genes a las células de la retina después de la administración intravítrea (IVT), una ruta de administración con ventajas significativas por sobre otros métodos de administración de genes al ojo humano (Ejemplo 1). Se evaluó el tropismo celular después de la administración intravítrea de la nueva variante de AVV que comprende una sustitución P34A y el péptido LAISDQTKHA (SEQ ID NO:28) insertado en el aminoácido 588 (LAISDQTKHA+P34A; SEQ ID NO:42) *in vivo* en primates no humanos (NHP) como ejemplo representativo de la capacidad de las variantes de AAV que contienen ISDQTKH (SEQ ID NO:14) para transducir las células de la retina.

[00254] Se elaboraron viriones de AAV recombinantes que comprendían una cápside de AAV2 o bien la nueva cápside variante LAISDQTKHA+P34A (SEQ ID NO:42) y un genoma que comprendía un transgén de proteína fluorescente verde (GFP) ligado en forma operativa 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) usando métodos estándares. Se inyectaron monos verdes africanos (**Figuras 7, 8**) o macacos cinomolgos (**Figura 9**) por vía intravítrea con diversas dosis del vector en el rango entre 4×10^{10} vg y 1×10^{12} vg por ojo (véanse las leyendas de la **Figura** para los detalles) y se evaluó la transducción de células de la retina *in vivo* mediante imágenes de fluorescencia de fondo de ojo con una Heidelberg Spectralis™.

[00255] La administración intravítrea de los AAV que comprenden la nueva variante LAISDQTKHA+P34A (SEQ ID NO:42) resultaron en una amplia y más robusta expresión de los transgenes en toda la retina de los NHP en comparación con el AAV2 (**Figuras 7-9**). Las imágenes revelan que la nueva variante de cápside de AVV provee una expresión robusta en el centro de la fovea (un área rica en conos); en el anillo parafoveal (un área rica en células ganglionares de la retina), y en la periferia (un área rica en muchos tipos de células incluyendo bastones, células gliales de Müller, células amácrinas, células bipolares) en forma tan temprana como a las 2 semanas después de la inyección. Por el contrario, y en consistencia con los resultados informados por otros autores, el AAV2 de tipo salvaje provee una expresión más débil que es principalmente en el anillo parafoveal y que solo se puede detectar en puntos de tiempo más tardíos. El análisis inmunohistoquímico de las diversas regiones de la retina, llevado a cabo 3 semanas después de la inyección, confirmó que muchos tipos

de células de la retina, incluyendo las células epiteliales pigmentarias de la retina, fotorreceptores en bastón y en cono, y las células ganglionares de la retina, se habían transducido exitosamente a lo largo de toda la retina (**Figuras 10A-10E**).

[00256] Este estudio ejemplifica la administración superior de genes mediante la variante que comprende ISDQTKH después de la administración por una ruta clínicamente preferida en comparación con el AAV2 clínicamente relevante. Se puede conseguir una eficacia similar con las otras variantes que comprenden este motivo de inserción peptídica. De forma similar, se puede conseguir una eficacia similar con las otras variantes divulgadas en la presente que se identificaron usando la misma estrategia de evolución dirigida.

[00257] Ejemplo 3

[00258] El tropismo celular de la nueva variante de AVV LAISDQTKHA+P34A (SEQ ID NO:42) para las células epiteliales pigmentarias de la retina (RPE) y las células fotorreceptoras (PR) se ensayó in vitro para su uso sobre células RPE y células PR generadas a partir de células madre pluripotentes inducidas humanas derivadas de fibroblastos (FB-iPSC) o células madre embrionarias humanas (ESC).

[00259] Se elaboraron viriones de AAV que comprendían una cápside de AAV2 o la nueva cápside variante LAISDQTKHA+P34A (SEQ ID NO:42) y un genoma que comprendía un transgén de proteína fluorescente verde (EGFP) conectados en forma operativa a un promotor CAG (AAV2.CAG.EGFP y LAISDQTKHA+P34A.CAG.EGFP, respectivamente) usando métodos estándares. Se generaron cultivos de células RPE humanas a partir de la línea de células madre embrionarias humanas ESI-017 o de células madre pluripotentes inducidas derivadas de fibroblastos humanos (FB-iPSC) usando un protocolo de diferenciación de 45 días. La maduración a células RPE se confirmó mediante la detección de la expresión de marcadores de RPE maduras incluyendo RPE65 y BEST1; la síntesis de VEGF y PEDF; y la capacidad para fagocitar segmentos externos de bastones. Se generaron los cultivos de PR mediante un paradigma de formación en lavajitos de múltiples pasos y se confirmó que comprendían las PR mediante la detección de la expresión de Recoverina y Opsina S después de 179 días de cultivo.

[00260] En relación a AAV2, la LAISDQTKHA+P34A (SEQ ID NO:42) proporcionó una eficacia de transducción expresión del transgén significativamente

mayor en cultivos de RPE humanas siete días después de la infección de acuerdo con la determinación por inmunofluorescencia (**Figuras 11A-B**), citometría de flujo (2,7 veces de incremento; **Figuras 11C-D**) y análisis por transferencia Western (**Figuras 11E-F**). De forma similar se consiguió una transducción y expresión robustas usando la LAISDQTKHA+P34A.CAG.EGFP en cultivos de PR humanas a los 32 días después de la infección. Este estudio ilustra la capacidad superior de las variantes que comprenden ISDQTKH (SEQ ID NO:14) para administrar genes a las células de la retina.

[00261] Ejemplo 4

[00262] Diseño y construcción de vectores de expresión anti-VEGF. La secuencia de aminoácidos de Aflibercept consiste en el péptido señal de Flt1 humano, el dominio 2 de VEGFR1, y el dominio 3 de VEGFR2 fusionados a la región Fc de IgG1 humana (**Figura 12A**; SEQ ID NO:66). Las secuencias de aminoácidos de las cadenas liviana y pesada de Ranibizumab se asociaron mediante un conector proteico flexible para convertir el fragmento de unión a antígeno de dos cadenas (Fab) en un Fab de cadena individual (scFab). La forma Liviana-Pesada (LH) consiste en el péptido señal de la cadena liviana kappa de Ig humana, los dominios variables de cadena liviana, constante de cadena liviana, variable de cadena pesada y constante de cadena pesada 1 de Ranibizumab conectados por el péptido flexible (**Figura 12B**; SEQ ID NO:71). La forma Pesada-Liviana (HL) es similar excepto porque el péptido señal deriva de la cadena pesada de IgG humana y los dominios pesado y liviano están en los lados opuestos del conector, en comparación con la forma LH (**Figura 12C**; SEQ ID NO:68). El diseño de Brolucizumab incluye los dominios variables de cadena liviana y variable de cadena pesada conectados mediante un péptido flexible con el péptido señal de la cadena liviana kappa de Ig humana para la secreción a partir de células de mamífero (**Figura 12D**; SEQ ID NO:75). Se optimizaron los codones de los marcos abiertos de lectura para mejorar la expresión a partir de células humanas y se sintetizaron en GeneArt o GenScript, y se suministraron en un vector de clonado plasmídico estándar. El ADN de interés se cortó del plásmido con las enzimas de restricción PstI y BglII y se insertó en el plásmido pAAV-CAG-SV40 pA entre el promotor CAG y la señal de poliA del SV40. El diseño de sc-Ranibizumab-Fc consiste en la forma LH de sc-Ranibizumab fusionada a la región Fc de IgG1 humana del diseño del Aflibercept (**Figura 12E**; SEQ ID NO:73). El diseño de Brolucizumab-Fc consiste en el Brolucizumab fusionado a la región Fc de IgG1 humana del diseño del Aflibercept

(**Figura 12F**; SEQ ID NO:77). Se amplificaron las regiones sc-Ranibizumab LH, Brolucizumab, y Fc por PCR a partir de los vectores de clonado iniciales con extensiones que contenían un sitio para la enzima de restricción de Tipo IIS BsmBI en el extremo 3' (sc-Ranibizumab LH y Brolucizumab) o en el extremo 5' (Fc). Los productos de PCR resultantes se digirieron con las enzimas de restricción PstI y BsmBI (sc-Ranibizumab LH y Brolucizumab) o BsmBI y BglII (Fc) y se insertaron en el plásmido pAAV-CAG-SV40 pA entre el promotor CAG y la señal de poliA del SV40. Se usaron reacciones de ligación para transformar *E. coli* y se identificaron los clones positivos mediante digestión de restricción. Se sembraron los clones a una escala mayor y se purificó el ADN plasmídico con el kit Qiagen Endo-Free Maxiprep. Se verificó la identidad de los plásmidos mediante digestión de restricción y secuenciación. El plásmido pAAV-CAG-SV40 poliA contiene las repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV2, lo que le permite a las secuencias anti-VEGF empaquetarse dentro de cápsides de AAV y administrarse a las células de interés de la retina a través de administración intravítrea.

[00263] Se hicieron transfecciones control de células HEK293T, o bien se transfectaron con plásmido que contenía GFP o un transgén anti-VEGF (sc-RNBZ HL (SEQ ID NO:67), sc-RNBZ LH1 (SEQ ID NO:69) y sc-RNBZ-LH2 (SEQ ID NO:70), AFLB (SEQ ID NO:65), BRO (SEQ ID NO:74)) bajo el control del promotor CAG usando el reactivo de transfección FuGene6 en dos experimentos por separado. Se recolectó el medio 48 horas después de la transfección y se ensayó con el kit Aflibercept ELISA KIT (Eagle Biosciences, Immunoguide IG-AA115). Se detectaron las proteínas anti-VEGF mediante el HRP-anti-Fc de IgG provisto como reactivo en el kit (control, GFP, y AFLB) o HRP-anti-IgG H+L (sc-RNBZ HL, sc-RNBZ LH1, y sc-RNBZ LH2). Se calcularon las concentraciones en relación a la proteína clínica Eylea (control, GFP, y AFLB) o Lucentis (sc-RNBZ HL, sc-RNBZ LH1, sc-RNBZ LH2, y BRO). En el primero de dos experimentos, la expresión de Aflibercept fue de aproximadamente 15 µg/ml y la expresión de sc-Ranibizumab estuvo en el rango entre 1,6 y 2,8 µg/ml, en donde las formas LH expresaron concentraciones similares y la expresión de la forma HL fue de una concentración aproximadamente dos veces inferior (**Figura 13A**). En el segundo experimento, la expresión de Aflibercept fue de aproximadamente 50 µg/ml y la expresión de sc-Ranibizumab LH1 fue de aproximadamente 4,0 µg/ml (**Figura 13B**). La señal con Brolucizumab fue muy baja, probablemente debido a un mal

reconocimiento por parte del anticuerpo de detección. No se detectó actividad de unión a VEGF en el medio de las transfecciones control o GFP.

[00264] Ejemplo 5

[00265] Para visualizar las proteínas anti-VEGF en forma directa y confirmar el tamaño de las proteínas, se llevó a cabo un análisis por transferencia Western del medio de células transfectadas con los plásmidos de expresión de GFP, Aflibercept (SEQ ID NO:65), sc-Ranibizumab (SEQ ID NOs:67, 69, y 70), o Brolucizumab (SEQ ID NO:74) (**Figura 14**). El medio de las células HEK293T transfectadas se corrió en un gel Bolt 4-12% Bis-Tris Plus (Invitrogen # de Catálogo NW04122BOX) y las proteínas separadas se transfirieron a nitrocelulosa con un dispositivo iBlot2. Se trató la membrana con anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana conjugado con HRP (Thermo # de Catálogo 31413, panel izquierdo) o anticuerpo de cabra anti-Fab de IgG humana (Thermo # de Catálogo 31482, panel derecho) usando un dispositivo iBind Flex, y se visualizó con SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate (Thermo # de Catálogo 34076). Las imágenes se capturaron con un dispositivo iBright FL1000 imager.

[00266] La muestra de Aflibercept aparece como similar a la proteína de comparación clínica Eylea. No hubo señal en las muestras de control negativo. La proteína de comparación clínica Lucentis se reduce a cadenas liviana y pesada separadas de 24 kD mientras que las proteínas del sc-Ranibizumab corren a aproximadamente 48 kD debido a la existencia de un conector polipéptido que une las cadenas liviana y pesada a una proteína individual. Hay presente una mayor cantidad de las formas LH de la proteína en comparación con la forma HL de la proteína, en consistencia con la cuantificación proteica que se obtuvo mediante el ELISA (**Figura 13A**). La señal de Brolucizumab es baja, probablemente debido a un mal reconocimiento por parte del anticuerpo de detección. La proteína migra a la masa molecular correcta de 24 kD.

[00267] Ejemplo 6

[00268] Se llevó a cabo un método adicional para determinar la actividad de unión a VEGF, un ELISA de competición para VEGF (**Figura 15**). Se incubaron las proteínas de comparación clínicas Eylea o Lucentis y medio de las células HEK293T transfectadas con VEGF 13 pM a temperatura ambiente durante una noche. Se ensayaron las muestras para estudiar VEGF libre usando el kit Quantikine VEGF ELISA kit (R&D Systems # de Catálogo DVE00). En el primero de dos experimentos,

las curvas de inhibición de las cuatro proteínas anti-VEGF de las muestras transfectadas fueron muy similares a las proteínas clínicas Eylea y Lucentis. Aflibercept y Eylea compitieron por el VEGF más fuertemente que las variantes de sc-Ranibizumab y Lucentis (**Figura 15A**). Las tres formas de sc-Ranibizumab (SEQ ID NOs:67, 69, y 70) fueron casi idénticas. En el segundo experimento, todas las construcciones anti-VEGF compitieron por el VEGF (**Figura 15B**). No hubo actividad de competición a partir de la muestra control negativa para GFP.

[00269] Ejemplo 7

[00270] Para confirmar que las proteínas anti-VEGF expresadas a partir de células transfectadas bloquean la unión de VEGF a su receptor, y por lo tanto su función, se mezclaron iguales concentraciones de proteínas de comparación clínicas y media de células HEK293T transfectadas, con 20 ng/ml de VEGF y se colocaron sobre células PathHunter KDR (DiscoverX 93-0996Y1). Estas células expresan proteínas de fusión de receptor de VEGF/beta-galactosidasa que producen beta-galactosidasa activa ante la unión a VEGF. Se lisaron las células 22 horas más tarde y se ensayaron para ver la actividad de beta-galactosidasa. Las curvas de inhibición de las proteínas anti-VEGF de las muestras transfectadas son iguales a las proteínas de comparación clínicas, lo que demuestra que las proteínas expresadas bloquean la función del VEGF en un ensayo basado en células (**Figura 16**). En dos experimentos subsiguientes, también se llevó a cabo el ensayo de neutralización de VEGF celular con volúmenes iguales de medio de células HEK293T transfectadas con construcciones anti-VEGF. En el primero de estos experimentos, se evaluaron los plásmidos de expresión de GFP, Aflibercept (SEQ ID NO:65), sc-Ranibizumab HL (SEQ ID NO:67), o sc-Ranibizumab LH1 (SEQ ID NO:69). Todas las construcciones anti-VEGF evaluadas neutralizaron al VEGF (**Figura 17A**). La forma LH de sc-Ranibizumab neutralizó al VEGF más fuertemente que la forma HL de sc-Ranibizumab. En el segundo experimento, se mezclaron plásmidos de expresión de GFP, Aflibercept (SEQ ID NO:65), sc-Ranibizumab LH1 (SEQ ID NO:69), o Brolucizumab (SEQ ID NO:74) con 8 ng/ml de VEGF y se colocaron sobre células PathHunter KDR (DiscoverX 93-0996Y1). Se lisaron las células 18 horas más tarde y se ensayaron para ver la actividad de beta-galactosidasa. Nuevamente, todas las construcciones anti-VEGF evaluadas neutralizaron al VEGF (**Figura 17B**). Hubo un leve efecto de matriz a partir de la muestra control de GFP a las diluciones ensayadas.

[00271] Ejemplo 8

[00272] Se transfectaron células de epitelio pigmentario de la retina (RPE) en forma de control, o bien se transfectaron con plásmido que contenía GFP o un transgén anti-VEGF bajo el control del promotor CAG usando el reactivo de transfección FuGeneHD. Se recolectó el medio 48 horas después de la transfección. La eficacia de transfección de las células RPE fue extremadamente baja, evidenciado por el número de células que expresan GFP (datos no mostrados), y por lo tanto, la actividad de unión a VEGF fue indetectable en el medio de estas transfecciones. Se evaluó la concentración total de VEGF en el medio para determinar si las bajas concentraciones de los agentes anti-VEGF podían reducir la secreción de VEGF de las RPE. Se recolectó medio 48 horas después de la transfección y se ensayó con el Quantikine VEGF ELISA kit (R&D Systems # de Catálogo DVE00). Se observó una gran reducción de los niveles de VEGF después de la expresión de Aflibercept (SEQ ID NO:65) y una leve reducción de los niveles de VEGF después de la expresión de sc-Ranibizumab (SEQ ID NOs:67, 69, y 70) (**Figura 18**). El efecto sobre los niveles de VEGF por parte de las tres formas de sc-Ranibizumab fue similar. Una vez administrados mediante la transducción más eficiente con AAV, los transgenes anti-VEGF resultaron en la producción de mayores concentraciones de proteínas anti-VEGF que se cuantificaron mediante el Aflibercept ELISA kit.

[00273] Ejemplo 9

[00274] Se usaron plásmidos de expresión para AAV portadores de genes para Aflibercept (SEQ ID NO:65), sc-Ranibizumab (SEQ ID NOs:67 y 69), o Brolucizumab (SEQ ID NO:74) para empaquetar el ADN viral en la cápside variante R100 (que tiene la secuencia de aminoácidos como se describe en la SEQ ID NO:42). Se transdujeron células RPE maduras 30 días después de la siembra en placas de 12 pocillos a MOI 5.000 con estos vectores en un volumen de 1,0 ml de medio X-Vivo10. Se cambió el medio tres días después de la transducción, se recolectó y se reemplazó seis días después de la transducción, y se recolectó y reemplazó nuevamente diez días después de la transducción.

[00275] Se ensayó la concentración total de VEGF en el medio con el Quantikine VEGF ELISA kit (R&D Systems # de Catálogo DVE00) para determinar el efecto de la transducción con los vectores anti-VEGF sobre el nivel de VEGF endógeno libre detectable secretado por las células RPE hacia el medio (**Figura 19**). El nivel endógeno de VEGF en las células transducidas con un vector control de GFP fue de 4.500 pg/ml en la muestra del día 6 y 8.300 pg/ml en la muestra del día 10. La

transducción con todos los vectores anti-VEGF resultó en un nivel de VEGF bajo o indetectable en el medio. Es probable que la cantidad de VEGF secretado por las células RPE no haya cambiado, sino que el VEGF del medio se unió a las proteínas anti-VEGF de manera que el mismo se hizo indetectable por ELISA. Se pueden llevar a cabo experimentos adicionales incluyendo transferencia Western para determinar la cantidad total de VEGF unido y sin unir.

[00276] También se ensayó el medio de las transducciones en RPE con el Aflibercept ELISA kit (Eagle Biosciences, Immunoguide IG-AA115). Se detectaron proteínas anti-VEGF con un anticuerpo HRP-anti-IgG H+L (ThermoFisher # de Catálogo 31410). Se calcularon las concentraciones en relación a la proteína clínica Eylea (AFLB y GFP) o Lucentis (sc-RNBZ HL, sc-RNBZ LH1, y BRO). La expresión de Aflibercept (SEQ ID NO:65) fue de aproximadamente 1.800 ng/ml en la muestra del día 6 y 2.800 ng/ml en la muestra del día 10. La expresión de sc-Ranibizumab estuvo en el rango entre 700 ng/ml para la muestra de HL (SEQ ID NO:67) del día 6 y 1.700 ng/ml para la muestra de LH (SEQ ID NO:69) del día 10 (**Figura 20**). La señal con Brolucizumab (SEQ ID NO:74) fue muy baja, probablemente debido a un mal reconocimiento por parte del anticuerpo de detección. No se detectó actividad de unión a VEGF en el medio de la transducción con GFP.

[00277] Ejemplo 10

[00278] Para visualizar las proteínas anti-VEGF directamente y confirmar el tamaño de las proteínas, se llevó a cabo un análisis por transferencia Western del medio de las células RPE transducidas (**Figura 21**). Se corrieron volúmenes iguales de medio del día 6 y del día 10 en geles Bolt 4-12% Bis-Tris Plus (Invitrogen # de Catálogo NW04122BOX) y las proteínas separadas se transfirieron a nitrocelulosa con un dispositivo iBlot2. Se trató la membrana con anticuerpo de cabra anti-Fc de IgG humana conjugado con HRP (Thermo # de Catálogo 31413, panel izquierdo) o anticuerpo de cabra anti-Fab de IgG humana (Thermo # de Catálogo 31482, panel derecho) usando un dispositivo iBind Flex, y se visualizó con SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate (Thermo # de Catálogo 34076). Se capturaron las imágenes con un dispositivo ChemiDoc MP imager.

[00279] Las muestras de Aflibercept (SEQ ID NO:65) parecen similares a la proteína de comparación clínica Eylea (black arrow). No hubo banda con movilidad correcta en la muestra control negativa para GFP. La proteína clínica Lucentis se reduce a cadenas liviana y pesada separadas de 24 kD, mientras que el sc-Ranibizumab HL

(SEQ ID NO:67) y LH (SEQ ID NO:69) no se separan y migran a masa molecular aparente de 58 kD, tal como lo indica la flecha de color gris. La señal con Brolucizumab (SEQ ID NO:74) es baja, probablemente debido a un mal reconocimiento por parte del anticuerpo de detección. La proteína migra a la masa molecular correcta de 26 kD, tal como lo indica la flecha punteada. Los niveles proteicos son bastante similares en las muestras del día 6 y del día 10.

[00280] Ejemplo 11

[00281] Como método adicional para determinar la actividad de unión a VEGF, se llevó a cabo un ELISA de competición para VEGF (**Figura 22**). Se incubaron volúmenes iguales de medio de células RPE transducidas con VEGF 13 pM a temperatura ambiente durante una noche. Se ensayaron las muestras para estudiar el VEGF libre usando el kit Quantikine VEGF ELISA kit (R&D Systems # de Catálogo DVE00). El medio de las células transducidas con todas las construcciones anti-VEGF compitió por el VEGF. Los resultados fueron similares para las muestras del día 6 y del día 10. No hubo actividad de competición a partir de la muestra control negativa para GFP. Los niveles de VEGF libre son mayores en las diluciones más bajas debido al VEGF endógeno producido por las células RPE.

[00282] Ejemplo 12

[00283] Para comparar la actividad de neutralización de VEGF de las proteínas anti-VEGF expresadas en las células RPE a partir de los vectores virales, se mezclaron volúmenes iguales de medio de células RPE transducidas con 8 ng/ml de VEGF y se colocaron sobre células PathHunter KDR (DiscoverX 93-0996Y1) (**Figura 23**). Se lisaron las células 18 horas más tarde y se ensayaron para ver la actividad de beta-galactosidasa. El medio de las células transducidas con todas las construcciones anti-VEGF neutralizó al VEGF. No se observó neutralización de VEGF con el medio de la transducción control de GFP.

[00284] Lo precedente es una mera ilustración de los principios de la invención. Ha de apreciarse que los expertos en la materia serán capaces de idear diversas disposiciones que, a pesar de que no se describen o muestran en forma explícita en la presente, encarnan los principios de la invención y se incluyen dentro de su espíritu y alcance. Más aún, toda la redacción ejemplificativa y condicional que se menciona en la presente tiene la intención principal de ayudar al lector en la comprensión de los principios de la invención y los conceptos aportados por los inventores como un avance

en el arte, y deben interpretarse como no limitados a dichos ejemplos y condiciones específicamente mencionadas.

[00285] Más aún, todas las declaraciones de la presente que mencionan principios, aspectos y formas de realización de la invención, así como también ejemplos específicos de las mismas, pretenden abarcar los equivalentes tanto estructurales como funcionales de los mismos. Además, se pretende que dichos equivalentes incluyan tanto a los equivalentes actualmente conocidos como a los equivalentes que se desarrollen en el futuro, es decir, cualquier elemento desarrollado que desempeñe la misma función, independientemente de su estructura. El alcance de la presente invención, por lo tanto, no se limita a las formas de realización ejemplificativas mostradas y descritas en la presente. Más bien, el alcance y espíritu de la presente invención se ve materializado en las reivindicaciones adjuntas.

FIGURA 1

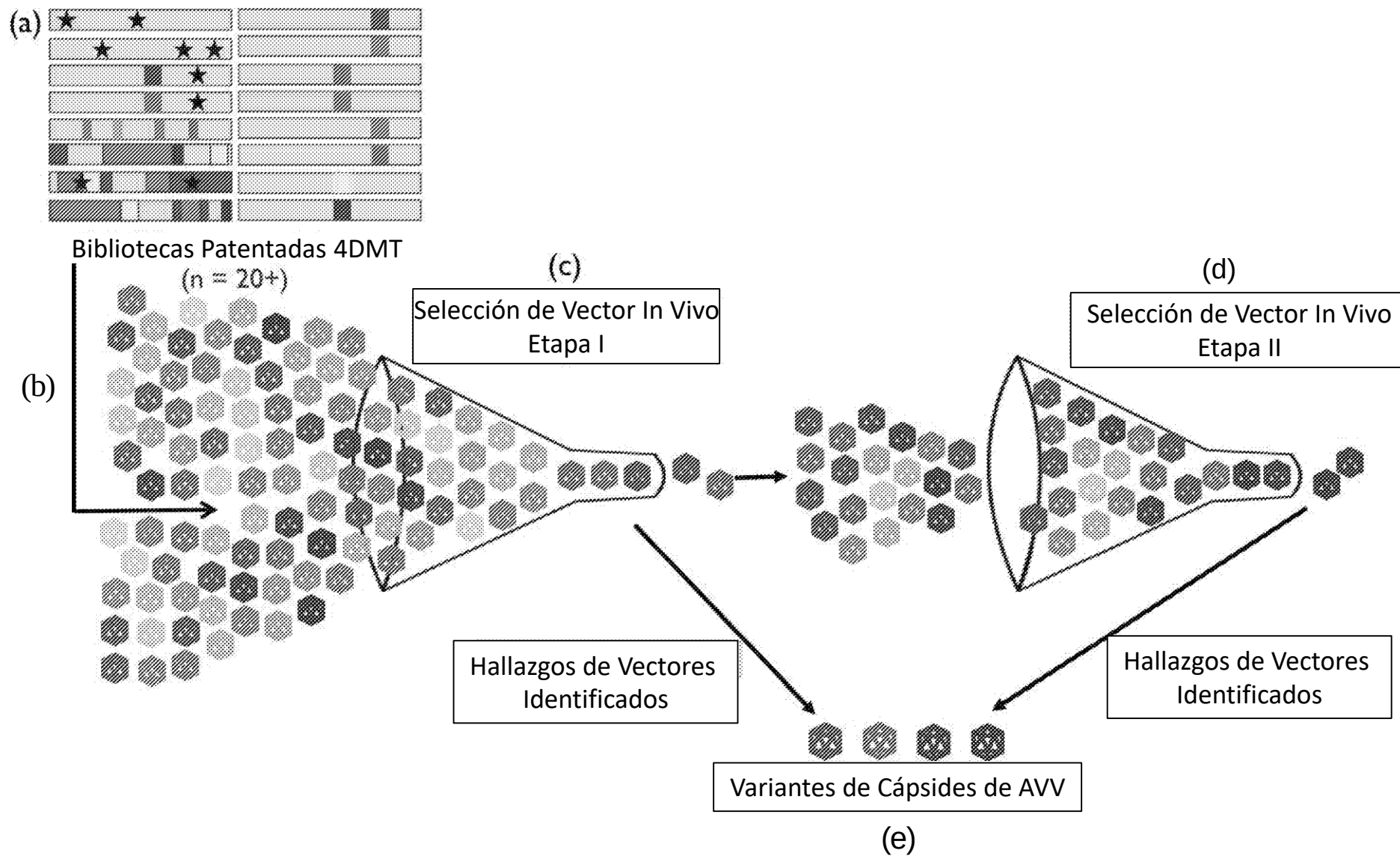


FIGURA 2

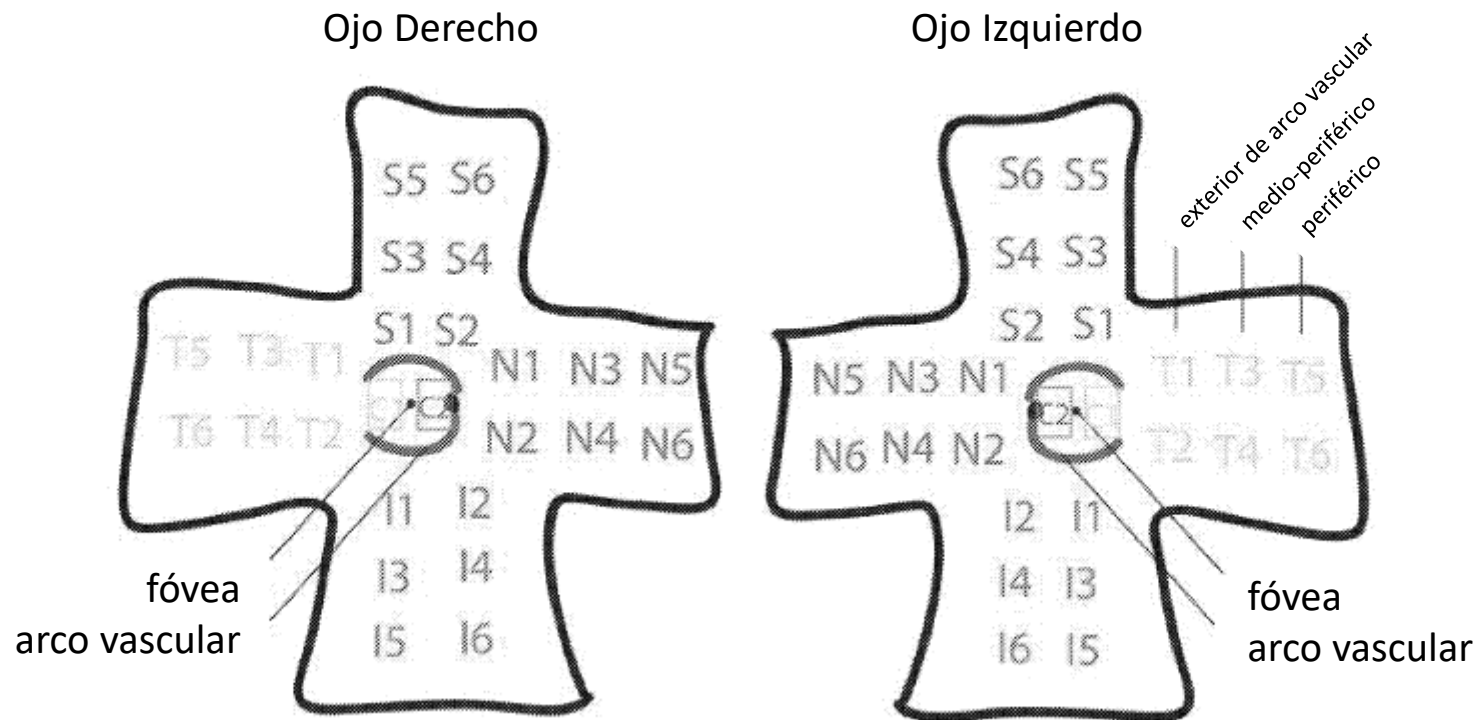


FIGURA 3

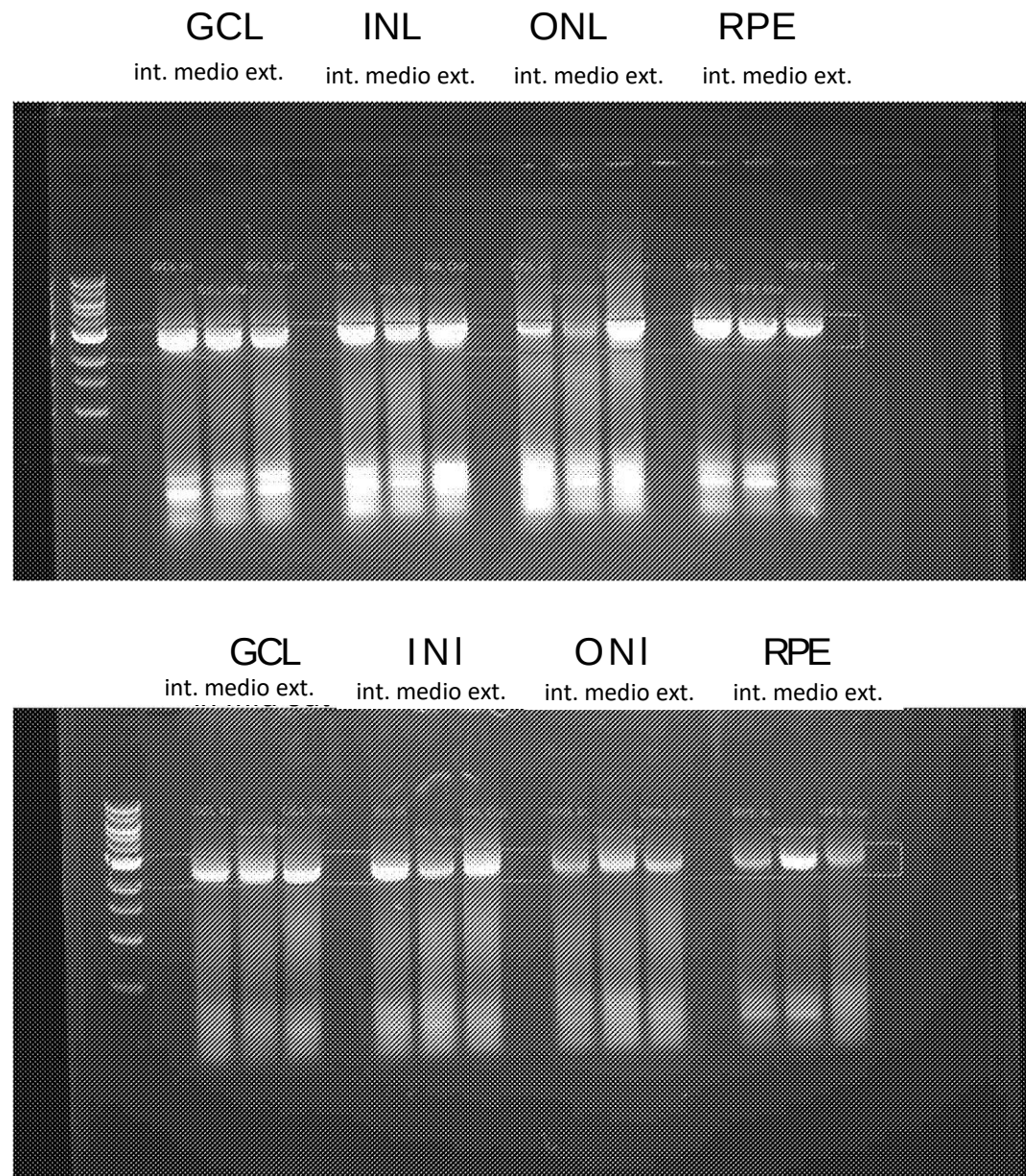


FIGURA 4

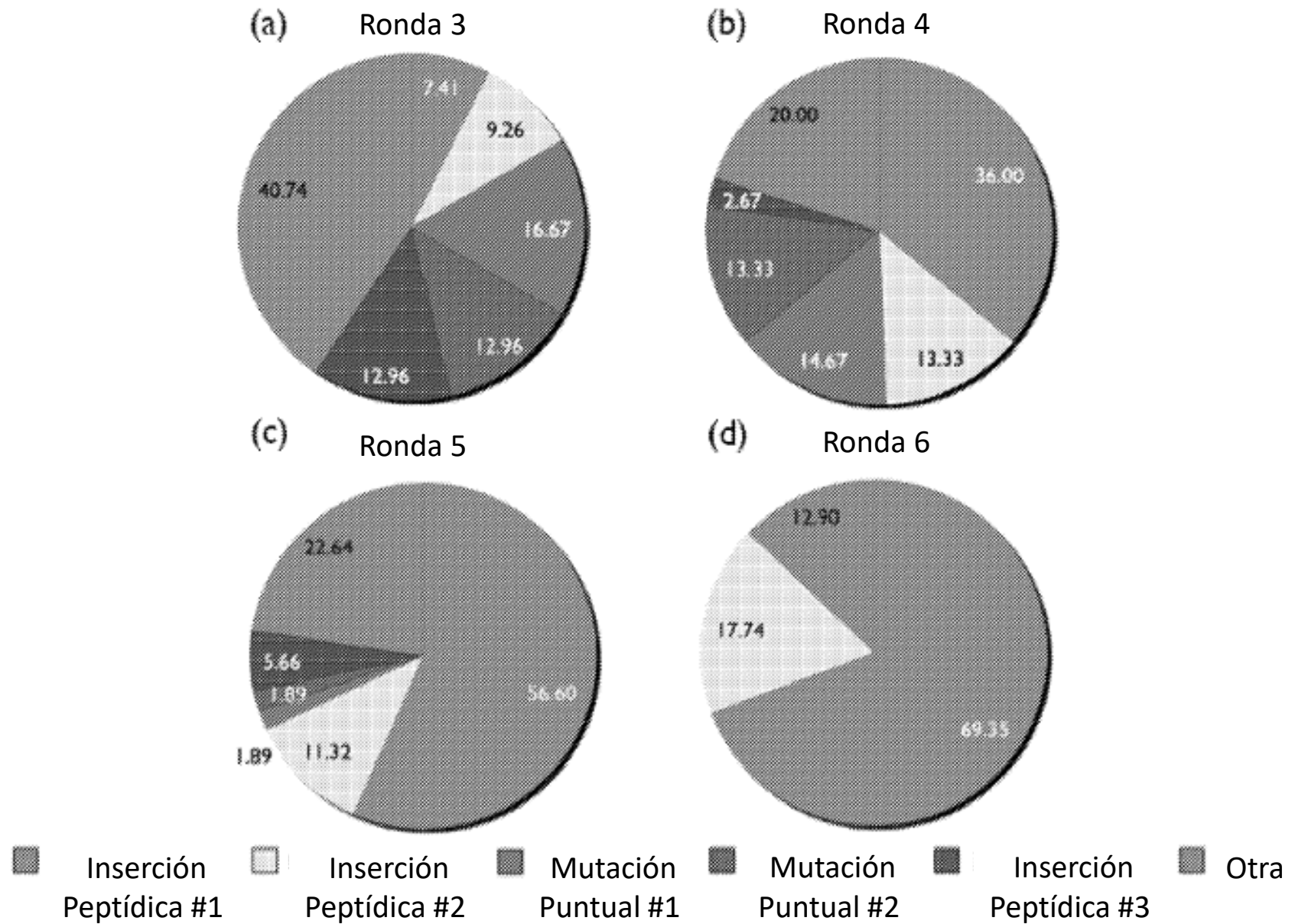


FIGURA 5

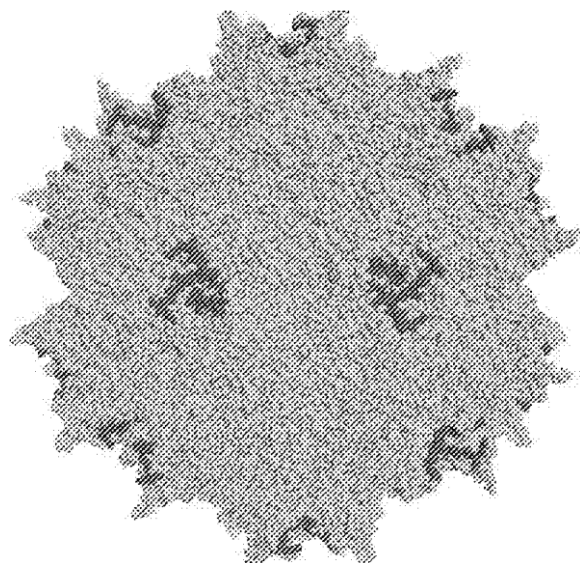


FIGURA 6A

	1	10	20	30
AAV1 (SEQ ID NO: 1)	1	10	20	30
	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPK			
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	1	10	20	30
	MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWWKLKPGPPPK			
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	1	10	20	30
	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGVPQPK			
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	1	10	20	30
	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGVPQPK			
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	1	9	19	29
	MTDGYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPK			
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	1	10	19	29
	MSFVDHPPDWLEE-VGEGRLREFLGLEAGPPKPK			
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	1	10	20	30
	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPK			
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	1	10	20	30
	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPK			
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	1	10	20	30
	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPKPK			
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	1	10	20	30
	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPK			
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	1	10	20	30
	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPK			

FIGURA 6B

	40	50	60
	40	50	60
AAV1 (SEQ ID NO: 1)	ANQQKQDDGRGLVLP	GYKYLGP	FNGLDKGE PVN
	40	50	60
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	PAERHKDDSRGLVLP	GYKYLGP	FNGLDKGE PVN
	40	50	60
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	ANQQHQDNRRGLVLP	GYKYLGP	GNGLDKGE PVN
	40	50	60
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	ANQQHQDNRRGLVLP	GYKYLGP	GNGLDKGE PVN
	39	49	59
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	ANQQHQDNARGLVLP	GYKYLGP	GNGLDKGE PVN
	39	49	59
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	PNQQHQDQARGLVLP	GYNYLGP	GNGLDRGE PVN
	40	50	60
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	ANQQKQDDGRGLVLP	GYKYLGP	FNGLDKGE PVN
	40	50	60
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	ANQQKQDNRRGLVLP	GYKYLGP	FNGLDKGE PVN
	40	50	60
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	ANQQKQDDGRGLVLP	GYKYLGP	FNGLDKGE PVN
	40	50	60
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	ANQQHQDNARGLVLP	GYKYLGP	GNGLDKGE PVN
	40	50	60
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	ANQQKQDDGRGLVLP	GYKYLGP	FNGLDKGE PVN

FIGURA 6C

AAV1 (SEQ ID NO: 1)	70 70	80 80	90 90	AADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAE
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	70 70	80 80	90 90	EADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAE
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	70 70	80 80	90 90	EADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAE
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	70 70	80 80	90 90	EADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAE
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	69 69	79 79	89 89	AADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAE
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	69 69	79 79	89 89	RADEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADAE
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	70 70	80 80	90 90	AADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAE
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	70 70	80 80	90 90	AADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAE
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	70 70	80 80	90 90	AADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAE
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	70 70	80 80	90 90	AADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAE
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	70 70	80 80	90 90	AADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAE

FIGURA 6D

	100	110	120	130
AAV1 (SEQ ID NO: 1)	100	110	120	130
	FQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLV			
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	100	110	120	130
	FQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLV			
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	100	110	120	130
	FQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLV			
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	100	110	120	130
	FQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLV			
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	99	109	119	129
	FQQRLOGDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLV			
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	99	109	119	129
	FQEKLAADDTSFGGNLGKAVFQAKKRVLEPFGLV			
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	100	110	120	130
	FQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLV			
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	100	110	120	130
	FQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLV			
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	100	110	120	130
	FQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLV			
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	100	110	120	130
	FQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILLEPLGLV			
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	100	110	120	130
	FQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLV			

FIGURA 6E

AAV1 (SEQ ID NO: 1)	140 140 EEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTGQ 140 150 159
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	EEPVKTAPGKKRPVEHSPV-EPDSSSGTGKAGQ 140 150 159
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	EEAAKTAPGKKGAVDQSPQ-EPDSSSGVGKSGK 140 150 159
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	EEAAKTAPGKKRPVDQSPQ-EPDSSSGVGKSGK 140 150 159
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	EQAGETAPGKKRPLIESPQ-QPDSSTGIGKKKGK 139 149 158
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	EEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKART-----EEDS 139 149 157
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	EEGAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSSGIGKTGQ 140 150 159
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	EEGAKTAPAKKRPVEPSPQSPDSSTGIGKKKGQ 140 150 160
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	EEGAKTAPGKKRPVEPSPQSPDSSTGIGKKKGQ 140 150 160
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	EEAAKTAPGKKRPVEQSPQ-EPDSSAGIGKSGA 140 150 159
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	EEAAKTAPGKKRPVEPSPQSPDSSTGIGKKKGQ 140 150 160

FIGURA 6F

AAV1 (SEQ ID NO: 1)	170 169 QPAKKRLNFGQTGDSESV PDPQPLGEPPATP - A
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	169 179 189 QPAKKRLNFGQTGDADSV PDPQPLGQPPAAP - S
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	169 179 189 QPAKKRLNFGQTGDSESV PDPQPLGEPPAAP - T
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	169 179 189 QPAKKRLNFGQTGDSESV PDPQPLGEPPAAP - T
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	168 175 185 QPAKKKLVFE --- DETGAGDGPP EGSTSGA --- M
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	165 168 178 KPST --- S SDAEAGPSGSQQLOIPAQPAS
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	169 179 189 QPAKKRLNFGQTGDSESV PDPQPLGEPPATP - A
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	170 180 190 QPAKKRLNFGQTGDSESV PDPQPLGEPPAAP - S
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	170 180 190 QPAKKRLNFGQTGDSESV PDPQPLGEPPAAP - S
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	169 179 189 QPAKKRLNFGQTGDTESV PDPQPIGEPPAAP - S
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	170 180 190 QPAKKRLNFGQTGESESV PDPQPIGEPPAGP - S

FIGURA 6G

AAV1 (SEQ ID NO: 1)	200 198	210 208	220 218	230 228
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	198	208	218	228
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	198	208	218	228
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	198	208	218	228
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	193	203	212	222
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	188	198	208	218
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	199	209	219	229
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	199	209	219	229
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	198	208	218	228
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	199	209	219	229
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	199	209	219	229

AVGPTT	MASGGGAP	MADNNE	GADGVGNASGNWH
GLGTNT	MATGSGAP	MADNNE	GADGVGNSSGNWH
SLGSNT	MASGGGAP	MADNNE	GADGVGNSSGNWH
SLGSNT	MASGGGAP	MADNNE	GADGVGNSSGNWH
SDDSEMRAAAGGA	AV -	EGGQGADGVGNASGDWH	
SLGADTM	SAGGGG	PLGDNNQGADGVGNASGDWH	
AVGPTT	MASGGGAP	MADNNE	GADGVGNASGNWH
SVGSGT	VAAGGGAP	MADNNE	GADGVGNASGNWH
GVGPNT	MAAGGGAP	MADNNE	GADGVGSSSGNWH
GVGSLT	MASGGGAP	VADNNE	GADGVGSSSGNWH
GLGSGT	MAAGGGAP	MADNNE	GADGVGSSSGNWH

FIGURA 6H

	240	250	260
	238	248	258
AAV1 (SEQ ID NO: 1)	C D S T W L G D R V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S		
	238	248	258
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	C D S T W M G D R V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S		
	238	248	258
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	C D S Q W L G D R V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S		
	238	248	258
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	C D S Q W L G D R V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S		
	232	242	252
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	C D S T W S E G H V T T T S T R T W V L P T Y N N H L Y K R L G E		
	228	238	248
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	C D S T W M G D R V V T K S T R T W V L P S Y N N H Q Y R E I K S		
	238	248	258
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	C D S T W L G D R V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S		
	239	249	259
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	C D S T W L G D R V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S S		
	239	249	259
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	C D S T W L G D R V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S N		
	238	248	258
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	C D S Q W L G D R V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S N		
	239	249	259
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	C D S T W L G D R V I T T S T R T W A L P T Y N N H L Y K Q I S N		

FIGURA 6I

AAV1 (SEQ ID NO: 1)	A - S T G A S N D N H Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	Q - - S G A S N D N H Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	Q - - S G A S N D N H Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	Q - - S G A S N D N H Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	- - - - - S L Q S N T Y N G F S T P W G Y F D F N R F H C H F S P
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	G S V D G - S N A N A Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H S H W S P
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	A - S T G A S N D N H Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	E - T A G S T N D N T Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	G T S G G A T N D N T Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	S T S G G S S N D N A Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	G T S G G S T N D N T Y F G Y S T P W G Y F D F N R F H C H F S P

FIGURA 6J

	300	310	320	330
AAV1 (SEQ ID NO: 1)	297 RDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFN	307 IQVKEVT	317 TN	327
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	296 RDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFN	306 IQVKEVT	316 QN	326
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	296 RDWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFN	306 IQVRGV	316 TN	326
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	296 RDWQRLINNNWGFRPKKLSFKLFN	306 IQVKEVT	316 QN	326
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	287 RDWQRLINNNWGM	297 RPKAMRVKIFN	307 IQVKEVT	317 TTS
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	297 RDWQRLINNNYWGFR	307 PRSLRVKIFN	317 IQVKEVT	327 TVQ
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	298 RDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFN	308 IQVKEVT	318 TN	328
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	299 RDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFN	309 IQVKEVT	319 TN	329
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	298 RDWQRLINNNWGFRPKRLSFKLFN	308 IQVKEVT	318 QN	328
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	299 RDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFN	309 IQVKEVT	319 DN	329
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	299 RDWQRLINNNWGFRPKRLSFKLFN	309 IQVKEVT	319 QN	329

FIGURA 6K

AAV1 (SEQ ID NO: 1)	DGVTTIANNNLTSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQ	340 337	350 347	360 357
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	DGTTTIANNNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQ	336	346	356
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	DGTTTIANNNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQ	336	346	356
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	DGTTTIANNNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQ	336	346	356
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	NGETTVANNLTSTVQIFADSSYELPYVMDAGQE	327	337	347
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	DSTTTIANNNLTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTE	327	337	347
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	DGVTTIANNNLTSTVQVFSDSEYQLPYVLGSAHQ	337	347	357
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	DGVTTIANNNLTSTIQVFSDSEYQLPYVLGSAHQ	338	348	358
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	EGTKTIANNNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQ	339	349	359
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	NGVKTIANNNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHE	338	348	358
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	EGTKTIANNNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQ	339	349	359

FIGURA 6 L

AAV1 (SEQ ID NO: 1)	370 367 GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLN--NGS-QAVGR
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	380 377 366 376 384 GCLPPFPADVFMVPQYGYLTLN--NGS-QAVGR
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	390 385 366 376 384 GCLPPFPADVFMVPQYGYLTLN--NGS-QAVGR
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	366 376 384 GCLPPFPADVFMVPQYGYLTLN--NGS-QAVGR
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	357 367 377 GSLPPFPNDVFMVPQYGYCGLVTGNTSQQTDR
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	357 367 377 GCLPAFPQVFTLPQYGYATLNRDNTE-NPTER
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	367 377 385 GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLN--NGS-QAVGR
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	368 378 386 GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLN--NGS-QSVGR
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	369 379 387 GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLN--NGS-QAVGR
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	368 378 386 GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLN--DGS-QAVGR
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	369 379 387 GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLN--NGS-QAVGR

FIGURA 6M

	400	410	420
	394	404	414
AAV1 (SEQ ID NO: 1)	SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVPFHS		
	393	403	413
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHS		
	393	403	413
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHS		
	393	403	413
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPFHS		
	387	397	407
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	NAFYCLEYFPSQMLRTGNNFEITYSFEKVPFHS		
	386	396	406
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	SSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHS		
	394	404	414
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHS		
	395	405	415
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYSFEDVPFHS		
	396	406	416
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFEDVPFHS		
	395	405	415
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHS		
	396	406	416
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	SSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYTFEDVPFHS		

FIGURA 6N

AAV1 (SEQ ID NO: 1)	430 424	440 434	450 444	460 453	SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQ-SGS
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	423	433	443	452	SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRT-NTPSGT
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	423	433	443	453	SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQGTTSGT
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	423	433	443	453	SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQGTTSGT
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	417	427	437	447	MYAHSQSLDRLMNPLIDQYLWGLQSTTTGTTLN
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	416	426	436	446	SFAPSQNLFKLANPLVDQYLYRFVSTNNTGG--
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	424	434	444	453	SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQ-SGS
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	425	435	445	455	SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLARTQSNPGGT
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	426	436	446	455	SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQTT-GGT
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	425	435	445	453	SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTIN--GSG
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	426	436	446	455	SYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQST-GGT

FIGURA 6 O

AAV1 (SEQ ID NO: 1)	470 463 A Q N K D L L F S R G S P A G M S V Q P K N W L P G P C Y R Q Q R
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	462 472 T T Q S R L Q F S Q A G A S D I R D Q S R N W L P G P C Y R Q Q R
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	463 473 T N Q S R L L F S Q A G P Q S M S L Q A R N W L P G P C Y R Q Q R
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	463 473 T N Q S R L L F S Q A G P Q S M S L Q A R N W L P G P C Y R Q Q R
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	457 467 A G T A T T N F T K L R P T N F S N F K K N W L P G P S I K Q Q G
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	449 459 - - - - - V Q F N K N L A G R Y A N T Y K N W F P G P M G R T Q G
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	463 473 A Q N K D L L F S R G S P A G M S V Q P K N W L P G P C Y R Q Q R
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	465 475 A G N R E L Q F Y Q G G P S T M A E Q A K N W L P G P C F R Q Q R
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	465 475 A N T Q T L G F S Q G G P N T M A N Q A K N W L P G P C Y R Q Q R
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	463 473 Q N Q Q T L K F S V A G P S N M A V Q G R N Y I P G P S Y R Q Q R
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	465 475 Q G T Q Q L L F S Q A G P A N M S A Q A K N W L P G P C Y R Q Q R

FIGURA 6P

	500	510	520
	493	498	508
AAV1 (SEQ ID NO: 1)	V S K T K T D N	N N S N F T W T G A S K Y N L N G R E S	
	492	497	507
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	V S K T S A D N	N N S E Y S W T G A T K Y H L N G R D S	
	493	498	508
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	L S K T A N D N	N N S N F P W T A A S K Y H L N G R D S	
	493	498	508
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	L S K T A N D N	N N S N F P W T A A S K Y H L N G R D S	
	487	497	507
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	F S K T A N Q N Y K I P A T G S D S L I K Y E T H S T L D G R W S		
	479	484	494
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	W N L G S G V N R	A S V S A F A T T N R M E L E G A S Y	
	493	498	508
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	V S K T K T D N	N N S N F T W T G A S K Y N L N G R E S	
	495	500	510
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	V S K T L D Q N	N N S N F A W T G A T K Y H L N G R N S	
	495	500	510
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	V S T T T G Q N	N N S N F A W T A G T K Y H L N G R N S	
	493	498	508
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	V S T T V T Q N	N N S E F A W P G A S S W A L N G R N S	
	495	500	510
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	V S T T L S Q N	N N S N F A W T G A T K Y H L N G R D S	

FIGURA 6Q

AAV1 (SEQ ID NO: 1)	530 518 IINPGTAMASHKDDKFFPM SGVMIF - GKESA 517 527 537 546
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	530 518 LVNPGPAMASHKDDKFFPQSGVLIF - GKQGS 517 527 537 546
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	530 518 LVNPGPAMASHKDDKFFPMHGNLIF - GKEGT 517 527 537 546
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	530 518 LVNPGPAMASHKDDKFFPMHGNLIF - GKEGT 517 527 537 546
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	530 518 ALTPGPPMATA GPADSKF - -SNSQLIFAGPKQN 517 527 537 546
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	530 518 QVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPAN 517 527 537 546
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	530 518 IINPGTAMASHKDDKDKFFPM SGVMIF - GKESA 517 527 537 546
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	530 518 LVNPGVAMATHKDDKDRFFPSSGVLIF - GKTGA 517 527 537 546
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	530 518 LANPGIAMATHKDDKDRFFPSNGILIF - GKQNA 517 527 537 546
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	530 518 LMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIF - GKQGT 517 527 537 546
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	530 518 LVNPGVAMATHKDDKDRFFPSSGVLMF - GKQGA 517 527 537 546

FIGURA 6R

AAV1 (SEQ ID NO: 1)	570 556 GASNTAL--DNVMITDEEEIKATNPVATERFGT	580 565	590 575
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	555 564 EKTNVDI--EKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGS	574	
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	556 565 TASNAEL--DNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGT	575	
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	556 565 TASNAEL--DNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGT	575	
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	554 563 GNTATVP--GTLIFTSEEEELAATNATD TDMWGN	573	
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	544 554 PGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQ	564	
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	556 565 GASNTAL--DNVMITDEEEIKATNPVATERFGT	575	
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	557 566 TNKTTL--ENVLMTNEEEIRPTNPVATEEYGI	576	
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	558 567 ARDNADY--SDVMLTSEEEIKTTNPVATEEYGI	577	
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	556 565 GRDNVDA--DKVMITNEEEIKTTNPVATESYGO	575	
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	558 567 GRDNVDY--SSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGV	577	

FIGURA 6S

	600	610	620
	585	595	605
AAV1 (SEQ ID NO: 1)	VAVNFOSSSTDPATG	VDVHAMGALPG	GMVWQDRDV
	584	594	604
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	VSTNLQRGNRQAATA	DVNTQGVLP	GMVWQDRDV
	585	595	605
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	VANNLQSSNTAPT	TGTVNHQ	GALPGMVWQDRDV
	585	595	605
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	VANNLQSSNTAPT	TRTVNDQ	GALPGMVWQDRDV
	583	593	603
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	LPGGDQSSNSNLPT	VDRLTALGAV	PGMVWQNRDI
	574	584	594
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	MATNNQSSSTTAP	ATGTYNLQ	EIVPGSVWMERDV
	585	595	605
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	VAVNLOSSSTDPAT	GDVHVMGAL	PGMVWQDRDV
	586	596	606
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	VSSNLQAANTAAQ	TQVVNNQ	GALPGMVWQNRDV
	587	597	607
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	VADNLQQQNTAPQ	IGTVNSQ	GALPGMVWQNRDV
	585	595	605
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	VATNHQSAQAQAQ	TGWVQNQ	GILPGMVWQDRDV
	587	597	607
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	VADNLQQQANTGP	IVGNVNSQ	GALPGMVWQNRDV

FIGURA 6T

	630	640	650	660																													
	615	625	635	645																													
AAV1 (SEQ ID NO: 1)	Y	L	Q	G	P	I	W	A	K	I	P	H	T	D	G	H	F	H	P	S	P	L	M	G	G	F	G	L	K	N	P	P	P
	614	624	634	644																													
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	Y	L	Q	G	P	I	W	A	K	I	P	H	T	D	G	H	F	H	P	S	P	L	M	G	G	F	G	L	K	H	P	P	P
	615	625	635	645																													
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	Y	L	Q	G	P	I	W	A	K	I	P	H	T	D	G	H	F	H	P	S	P	L	M	G	G	F	G	L	K	H	P	P	P
	615	625	635	645																													
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	Y	L	Q	G	P	I	W	A	K	I	P	H	T	D	G	H	F	H	P	S	P	L	M	G	G	F	G	L	K	H	P	P	P
	613	623	633	643																													
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	Y	Y	Q	G	P	I	W	A	K	I	P	H	T	D	G	H	F	H	P	S	P	L	I	G	G	F	G	L	K	H	P	P	P
	604	614	624	634																													
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	Y	L	Q	G	P	I	W	A	K	I	P	E	T	G	A	H	F	H	P	S	P	A	M	G	G	F	G	L	K	H	P	P	P
	615	625	635	645																													
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	Y	L	Q	G	P	I	W	A	K	I	P	H	T	D	G	H	F	H	P	S	P	L	M	G	G	F	G	L	K	H	P	P	P
	616	626	636	646																													
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	Y	L	Q	G	P	I	W	A	K	I	P	H	T	D	G	N	F	H	P	S	P	L	M	G	G	F	G	L	K	H	P	P	P
	617	627	637	647																													
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	Y	L	Q	G	P	I	W	A	K	I	P	H	T	D	G	N	F	H	P	S	P	L	M	G	G	F	G	L	K	H	P	P	P
	615	625	635	645																													
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	Y	L	Q	G	P	I	W	A	K	I	P	H	T	D	G	N	F	H	P	S	P	L	M	G	G	F	G	M	K	H	P	P	P
	617	627	637	647																													
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	Y	L	Q	G	P	I	W	A	K	I	P	H	T	D	G	N	F	H	P	S	P	L	M	G	G	F	G	L	K	H	P	P	P

FIGURA 6U

	670	680	690
	655	665	675
AAV1 (SEQ ID NO: 1)	QILIKNTPV	PANPPAEFSATKFASFITQYSTGQ	
	654	664	674
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	QILIKNTPV	PANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQ	
	655	665	675
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	QIMIKNTPV	PANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQ	
	655	665	675
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	QIMIKNTPV	PANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQ	
	653	663	673
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	QIFIKNTPV	PANPATTFSSSTPVNSFITQYSTGQ	
	644	653	663
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	MMLIKNTPV	PGN-ITSFSDVPVSSFITQYSTGQ	
	655	665	675
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	QILIKNTPV	PANPPAEFSATKFASFITQYSTGQ	
	656	666	676
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	QILIKNTPV	PANPPEVFTPAKFASFITQYSTGQ	
	657	667	677
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	QILIKNTPV	PADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQ	
	655	665	675
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	QILIKNTPV	PADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQ	
	657	667	677
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	QILIKNTPV	PADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQ	

FIGURA 6V

	700	710	720
	685	695	705
AAV1 (SEQ ID NO: 1)	V S V E I E W E L Q K E N S K R W N P E V Q Y T S N Y A K S A N V		
	684	694	704
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	V S V E I E W E L Q K E N S K R W N P E I Q Y T S N Y N K S V N V		
	685	695	705
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	V S V E I E W E L Q K E N S K R W N P E I Q Y T S N Y N K S V N V		
	685	695	705
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	V S V E I E W E L Q K E N S K R W N P E I Q Y T S N Y N K S V N V		
	683	693	703
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	V S V Q I D W E I Q K E R S K R W N P E V Q F T S N Y G Q Q N S L		
	673	683	693
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	V T V E M E W E L K K E N S K R W N P E I Q Y T N N Y N D P Q F V		
	685	695	705
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	V S V E I E W E L Q K E N S K R W N P E V Q Y T S N Y A K S A N V		
	686	696	706
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	V S V E I E W E L Q K E N S K R W N P E I Q Y T S N F E K Q T G V		
	687	697	707
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	V S V E I E W E L Q K E N S K R W N P E I Q Y T S N Y Y K S T S V		
	685	695	705
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	V S V E I E W E L Q K E N S K R W N P E I Q Y T S N Y Y K S N N V		
	687	697	707
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	V S V E I E W E L Q K E N S K R W N P E I Q Y T S N Y Y K S T N V		

FIGURA 6W

	730	740	750	752
	715	725	737	
AAV1 (SEQ ID NO: 1)	DFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL*			
	714	724	736	
AAV2 (SEQ ID NO: 2)	DFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL*			
	715	725	736	
AAV3A (SEQ ID NO: 3)	DFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL			
	715	725	736	
AAV3B (SEQ ID NO: 4)	DFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL			
	713	723	735	
AAV4 (SEQ ID NO: 5)	LWAPDAAGKYTEPRAIGTRYLTHHL*			
	703	713	725	
AAV5 (SEQ ID NO: 6)	DFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL*			
	715	725	737	
AAV6 (SEQ ID NO: 7)	DFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL*			
	716	726	738	
AAV7 (SEQ ID NO: 8)	DFAVDSQGVYSEPRPIGTRYLTRNL*			
	717	727	739	
AAV8 (SEQ ID NO: 9)	DFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL*			
	715	725	737	
AAV9 (SEQ ID NO: 10)	EFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL*			
	717	727	738	
AAV10 (SEQ ID NO: 11)	DFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL			

FIGURA 7

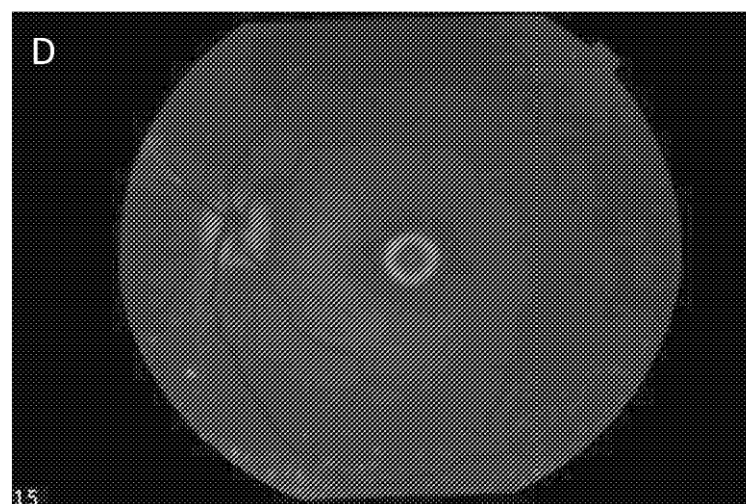
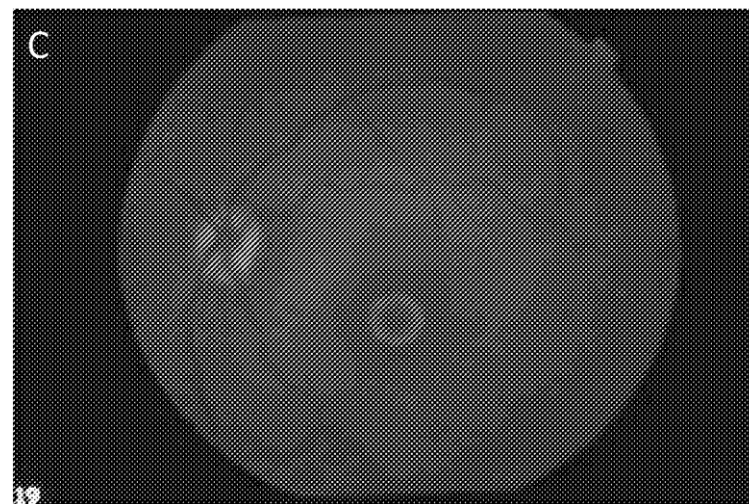
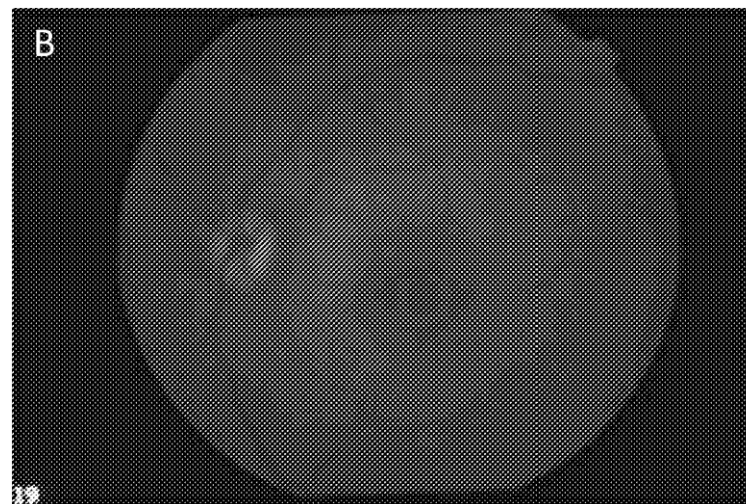
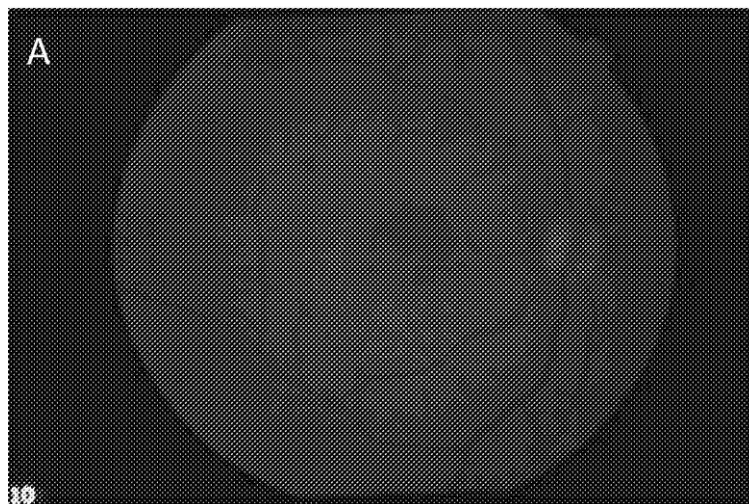


FIGURA 8

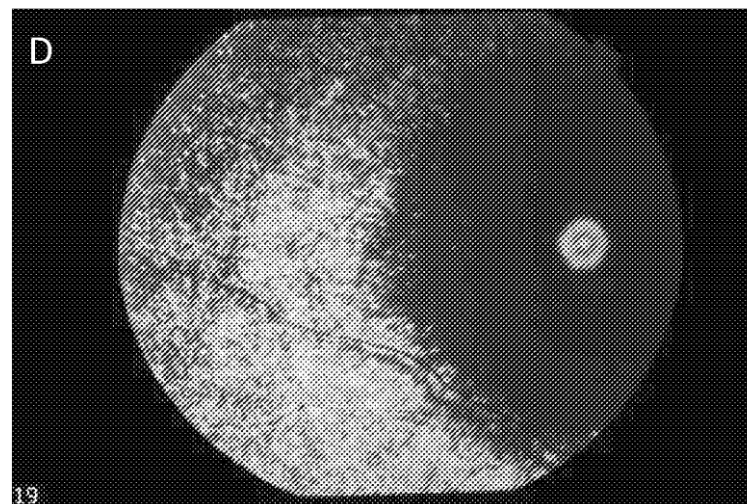
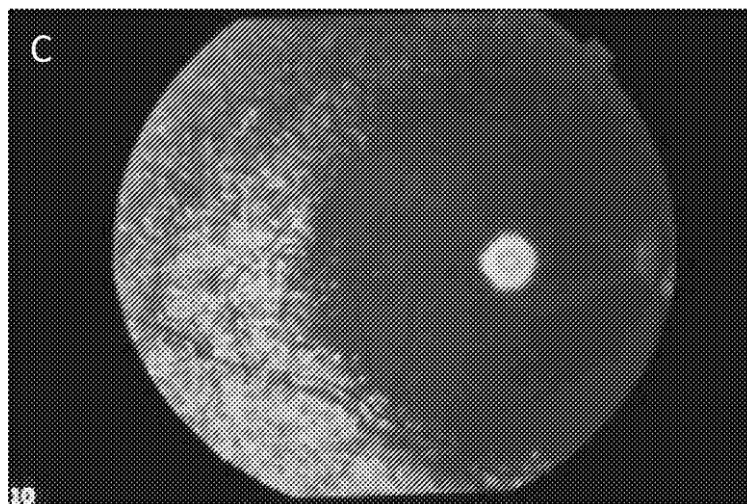
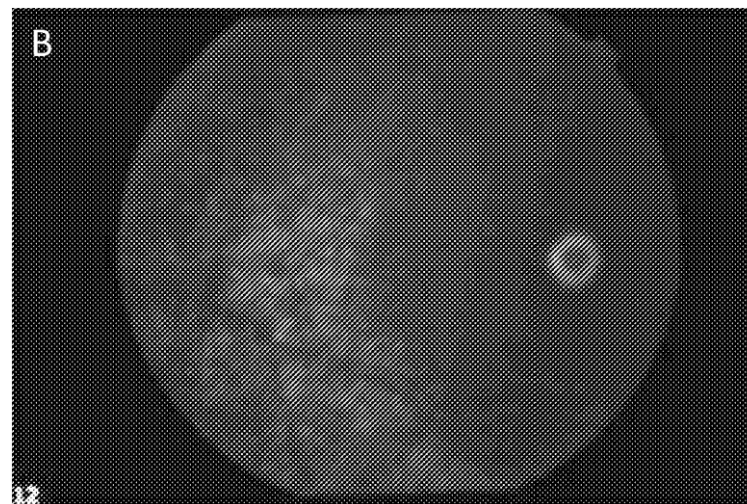
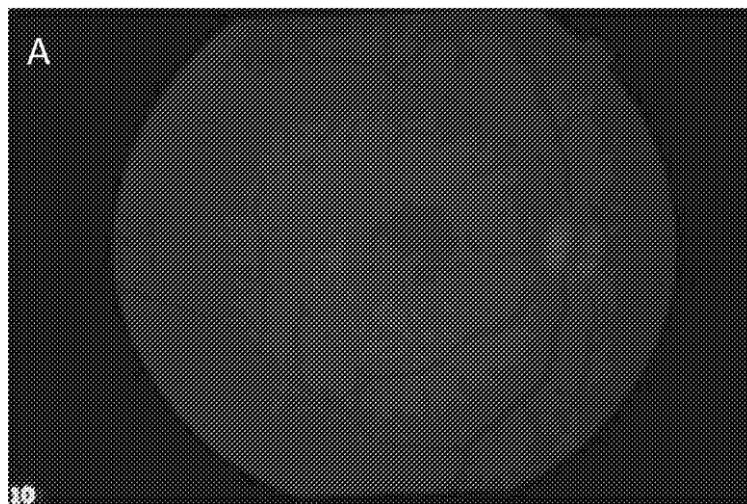


FIGURA 9

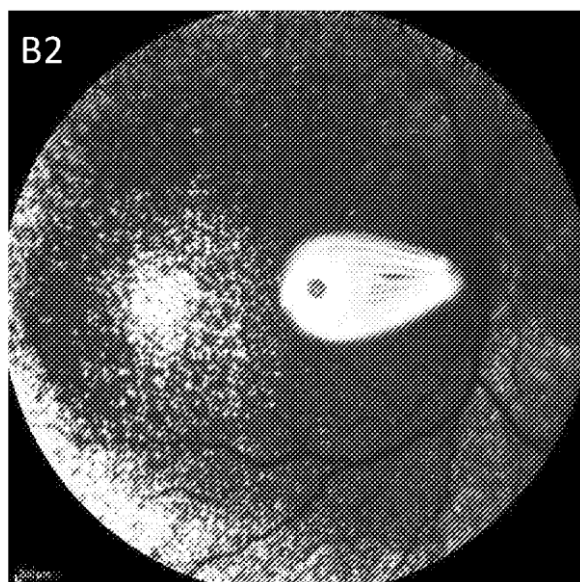
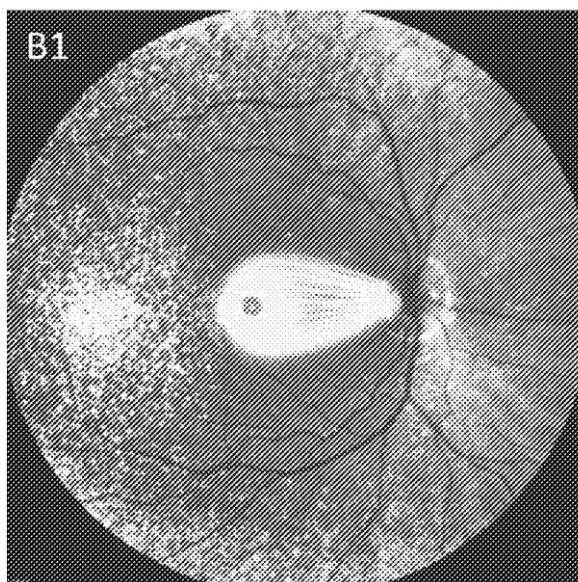
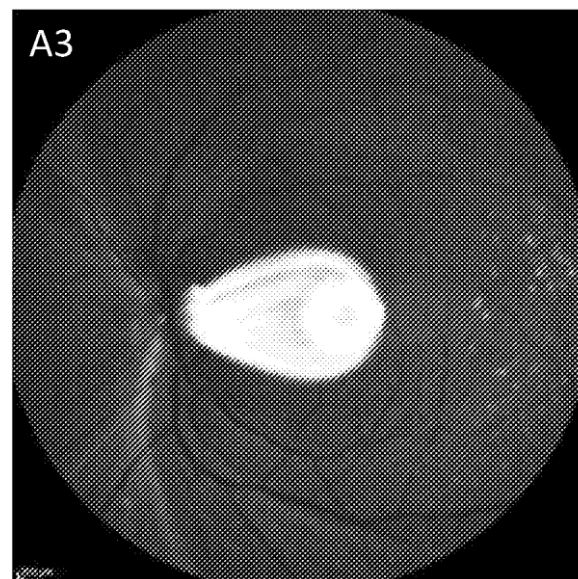
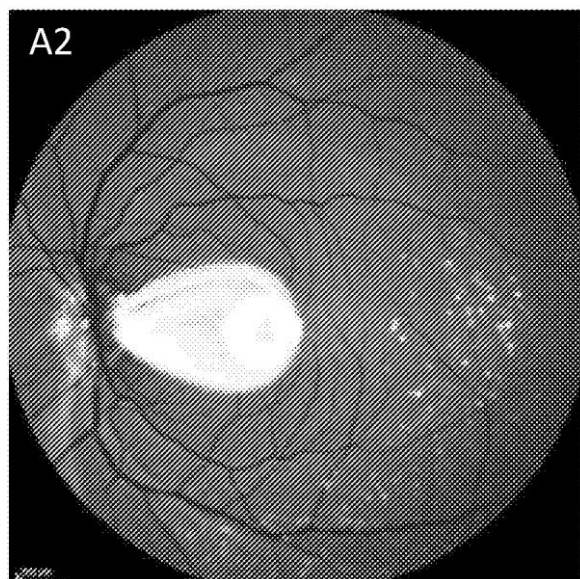
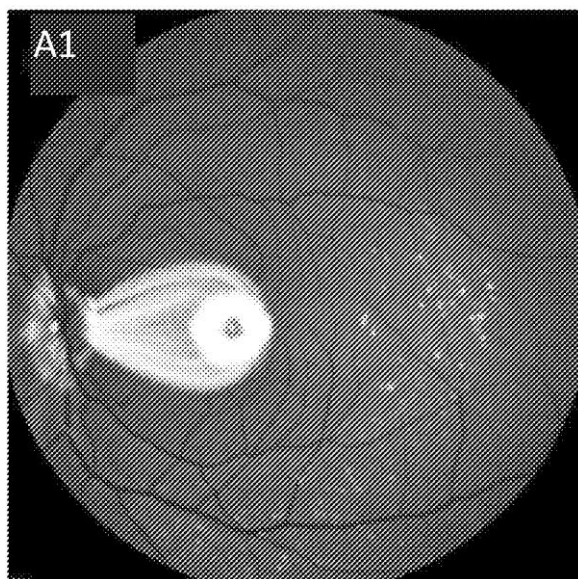


FIGURA 10A

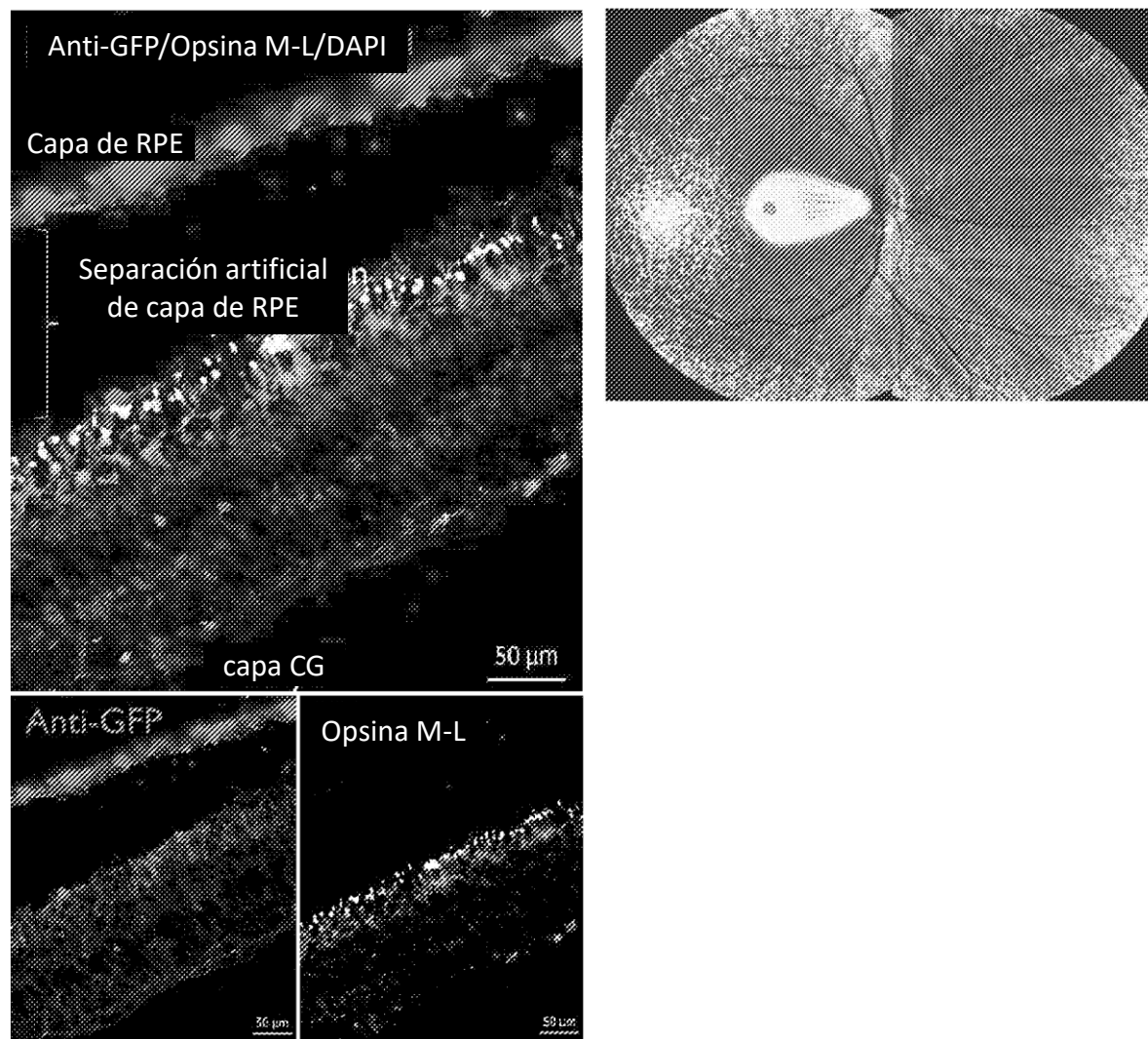


FIGURA 10B

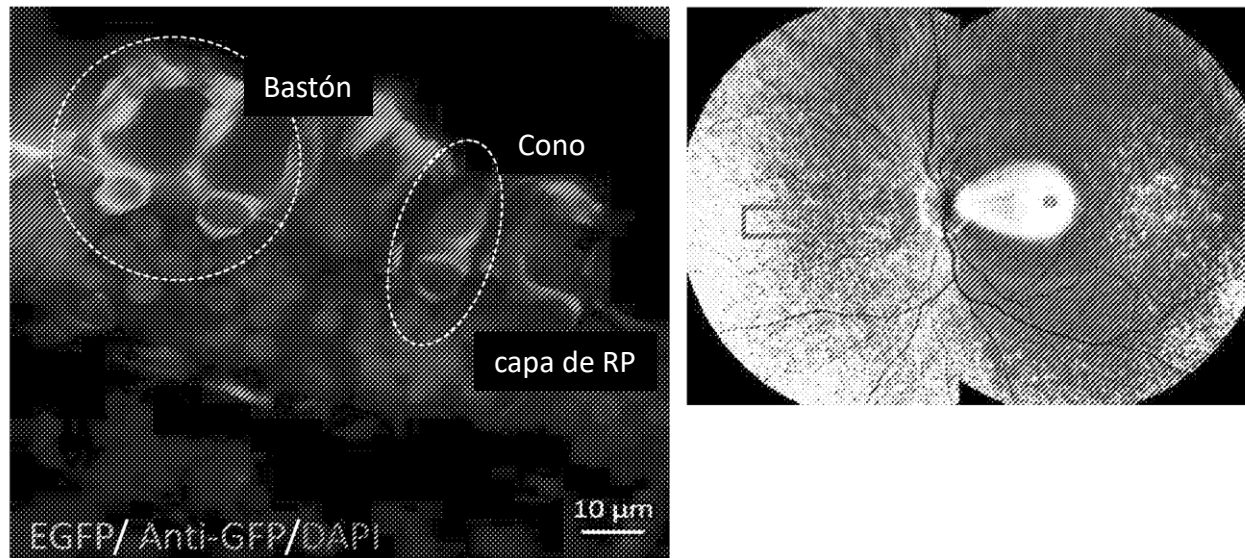


FIGURA 10C

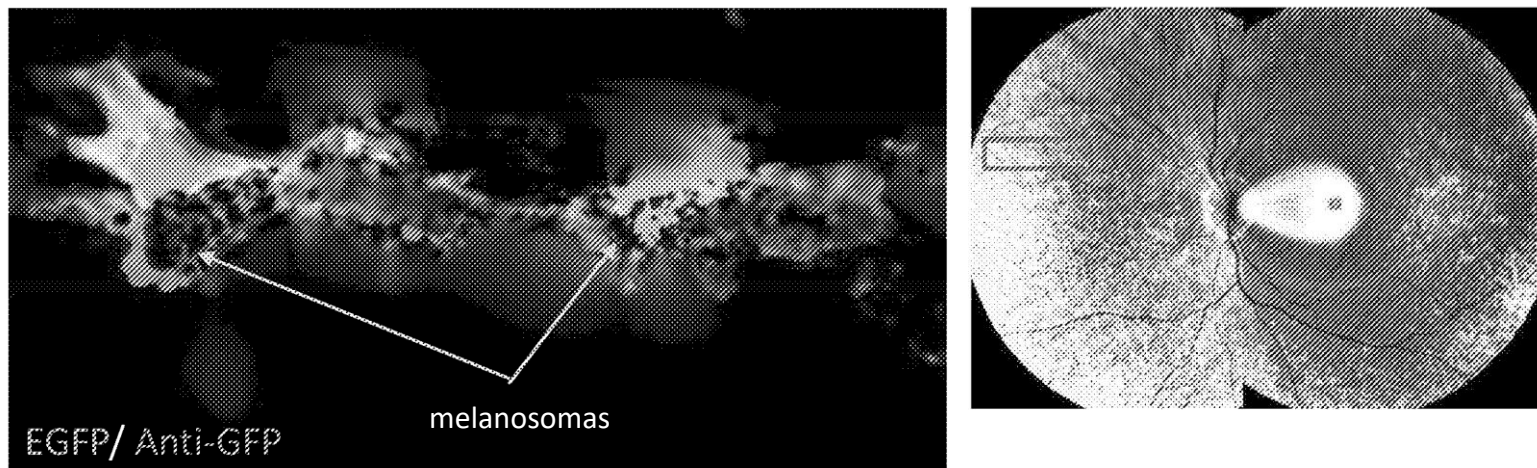


FIGURA 10D

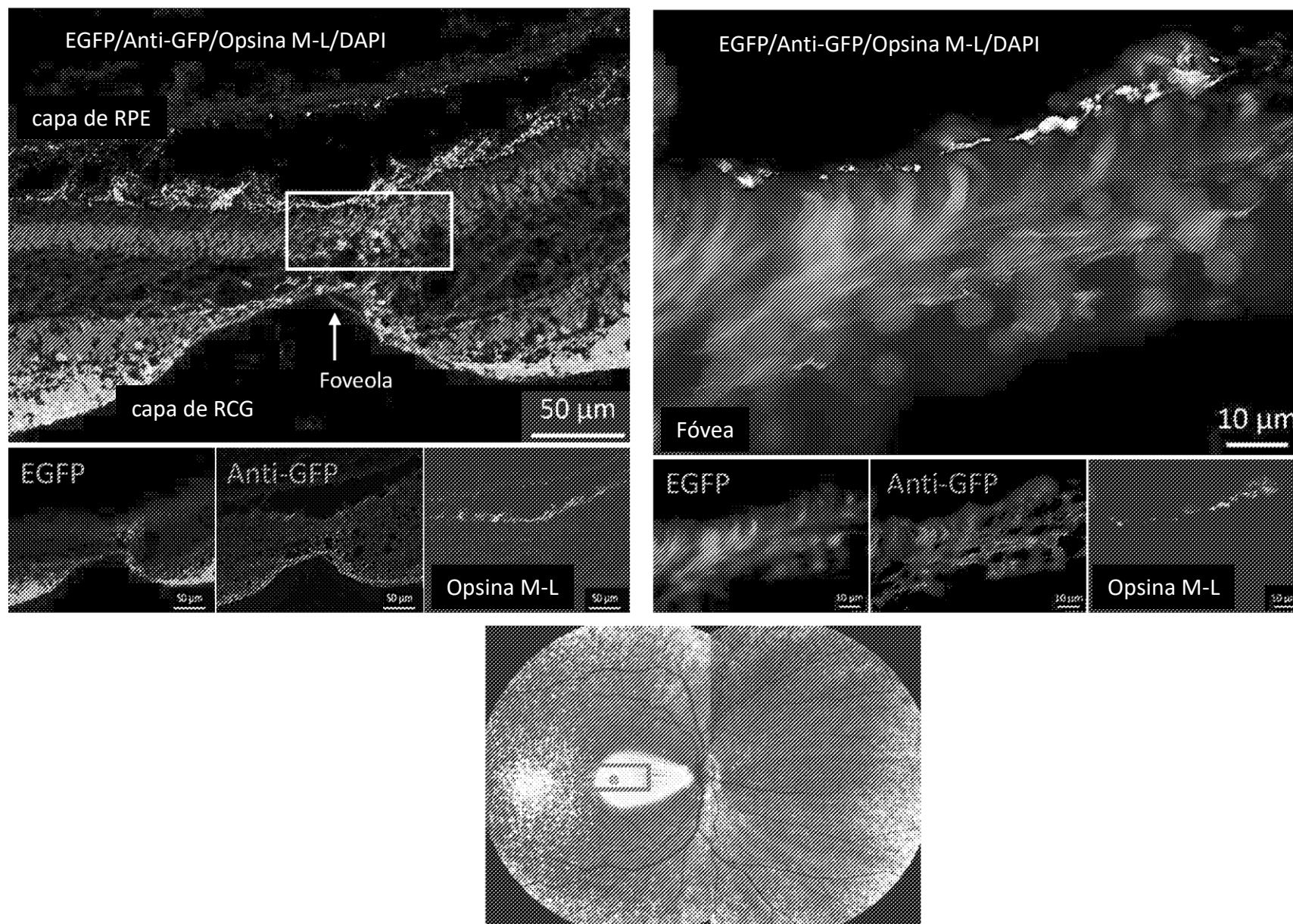


FIGURA 10E

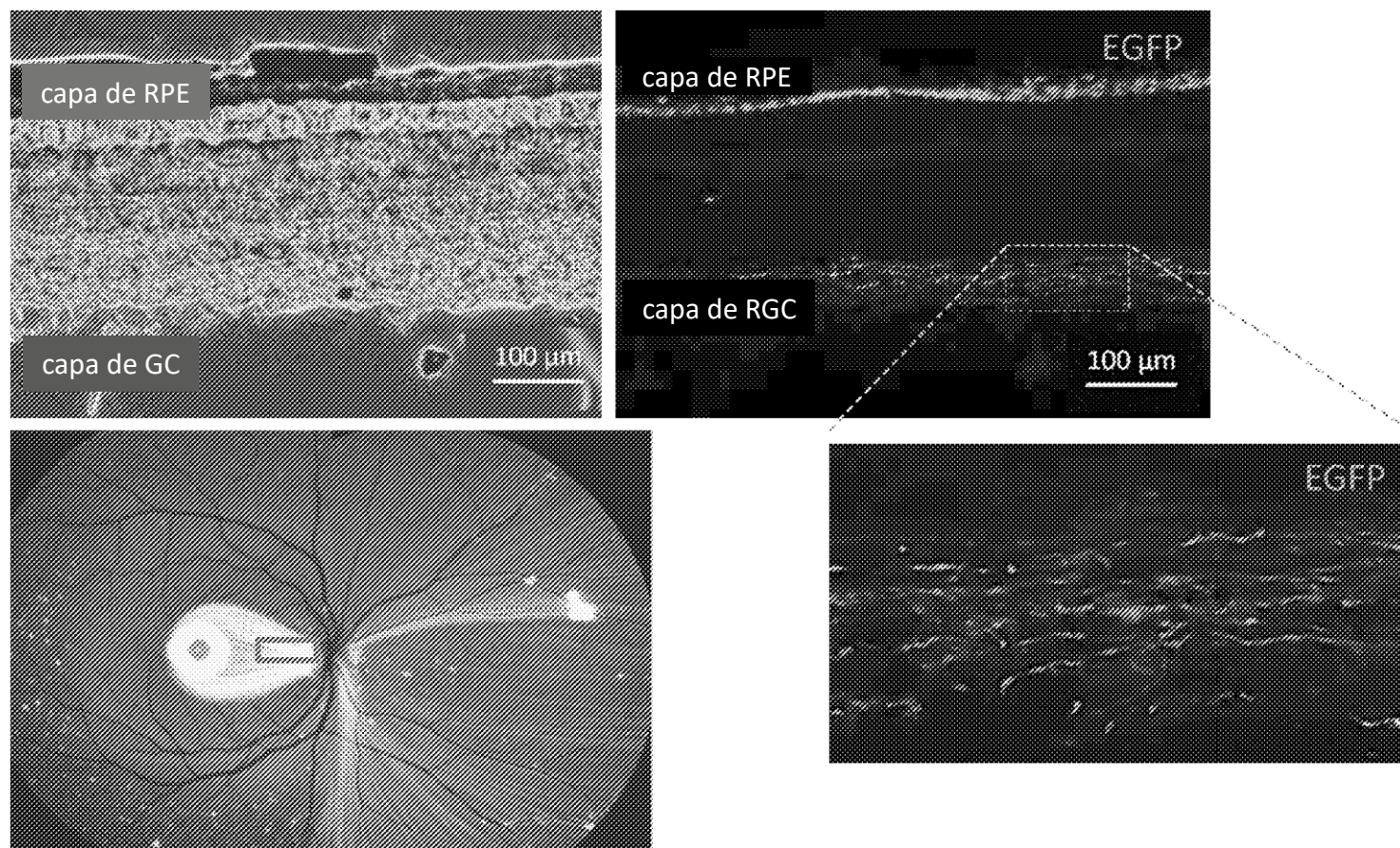


FIGURA 11A

A. RPE derivadas de ESC Humanas

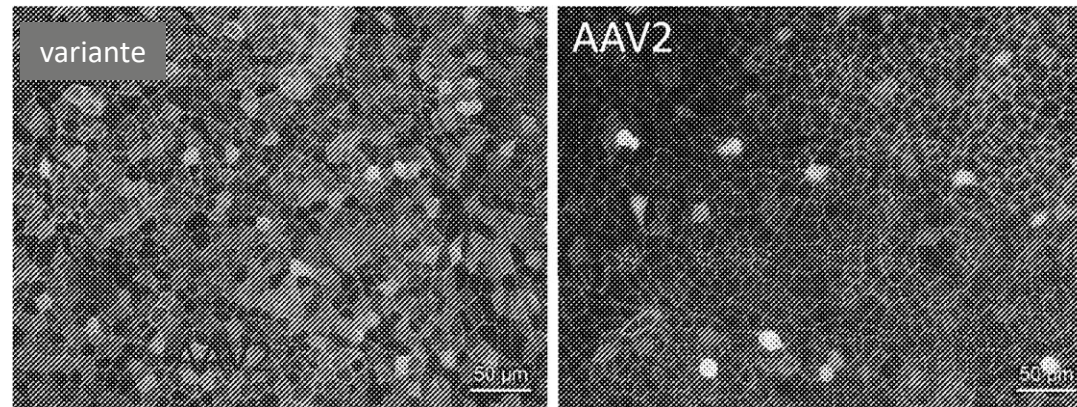


FIGURA 11B B. RPE derivadas de FB-iPSC Humanas

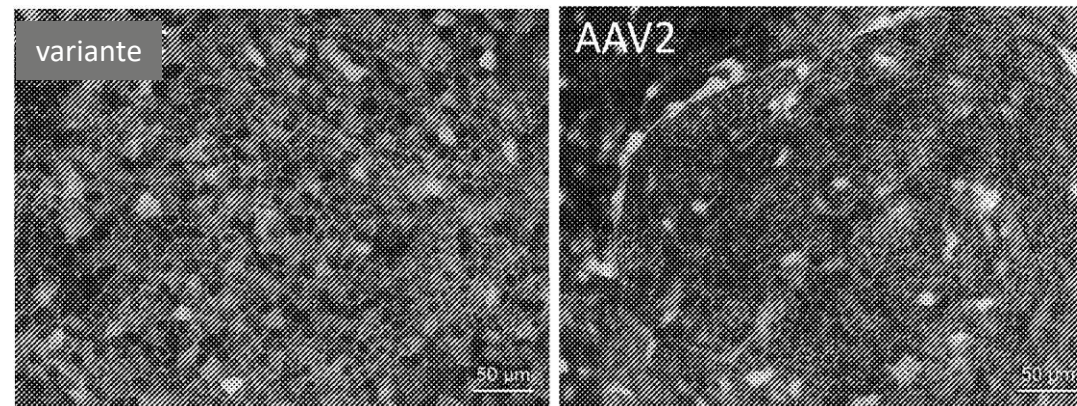
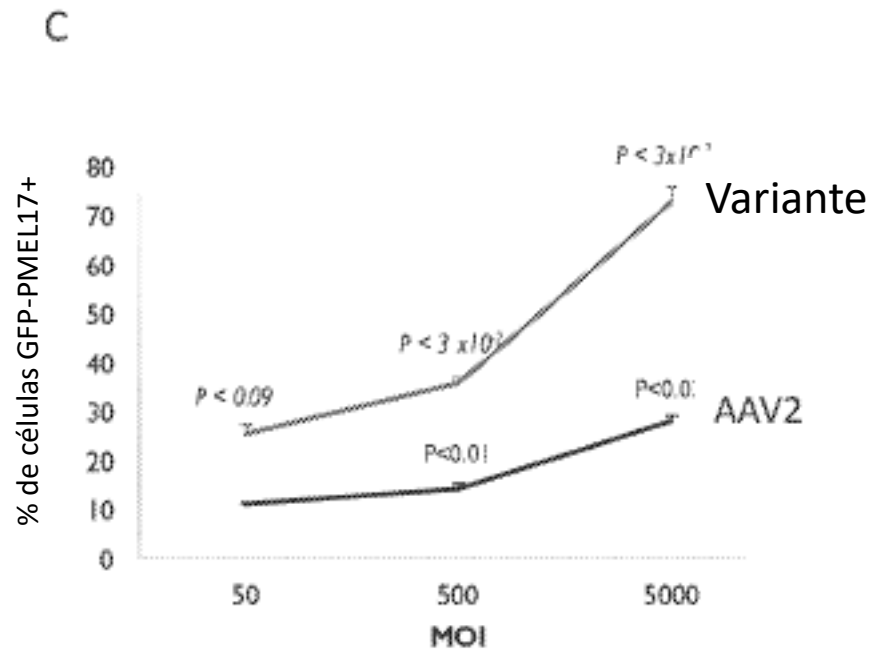
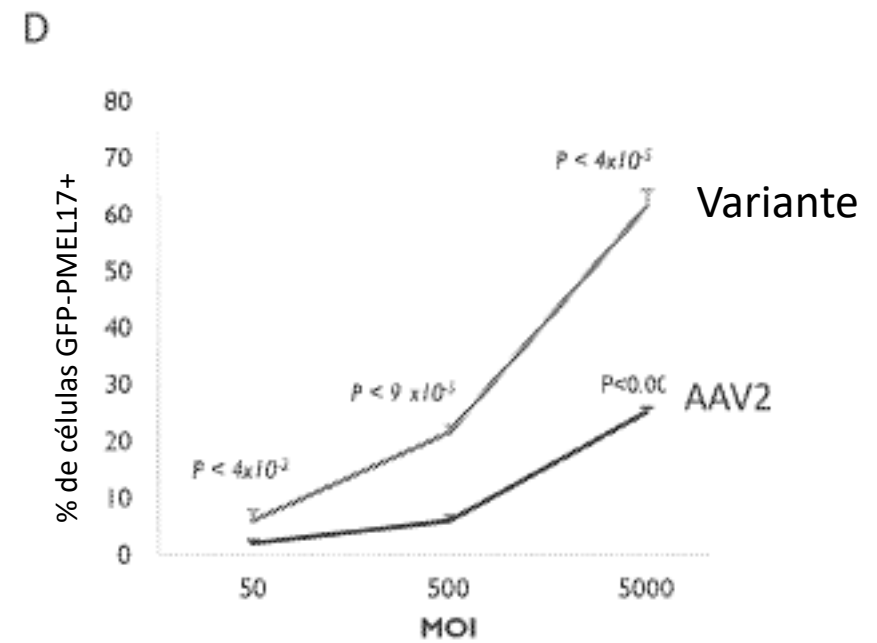


FIGURA 11C



RPE derivadas de ESC Humanas

FIGURA 11D



RPE derivadas de FB-iPSC Humanas

FIGURA 11E

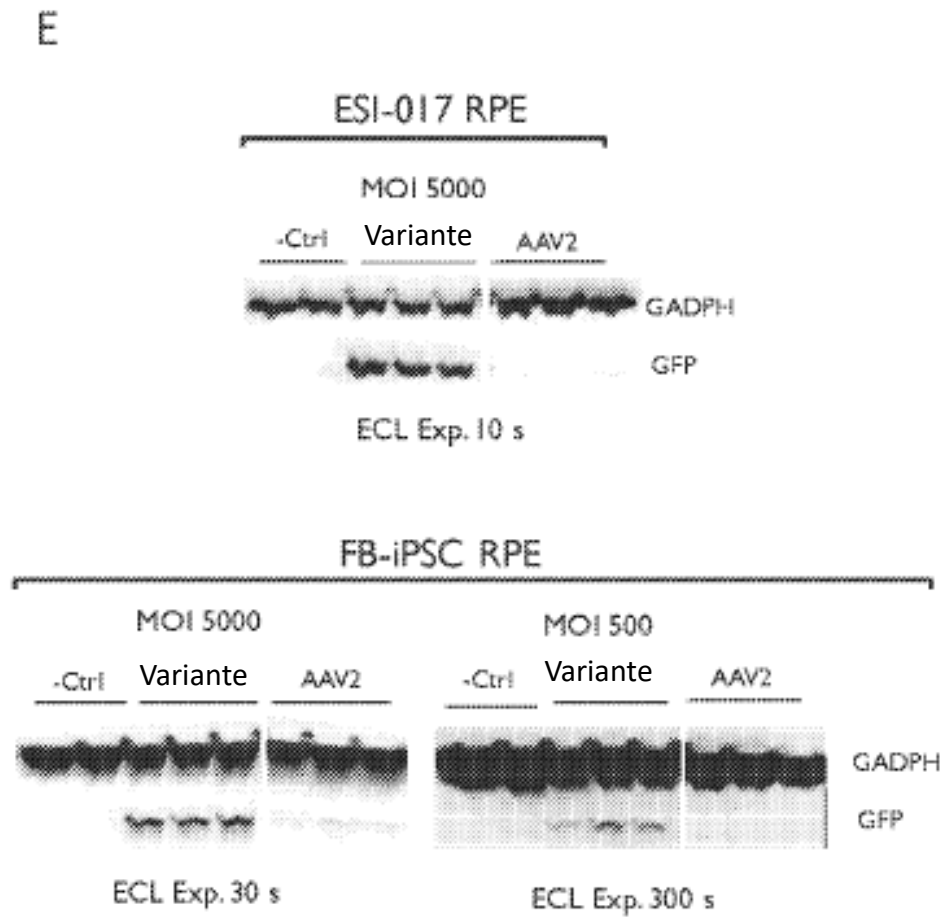


FIGURA 11F

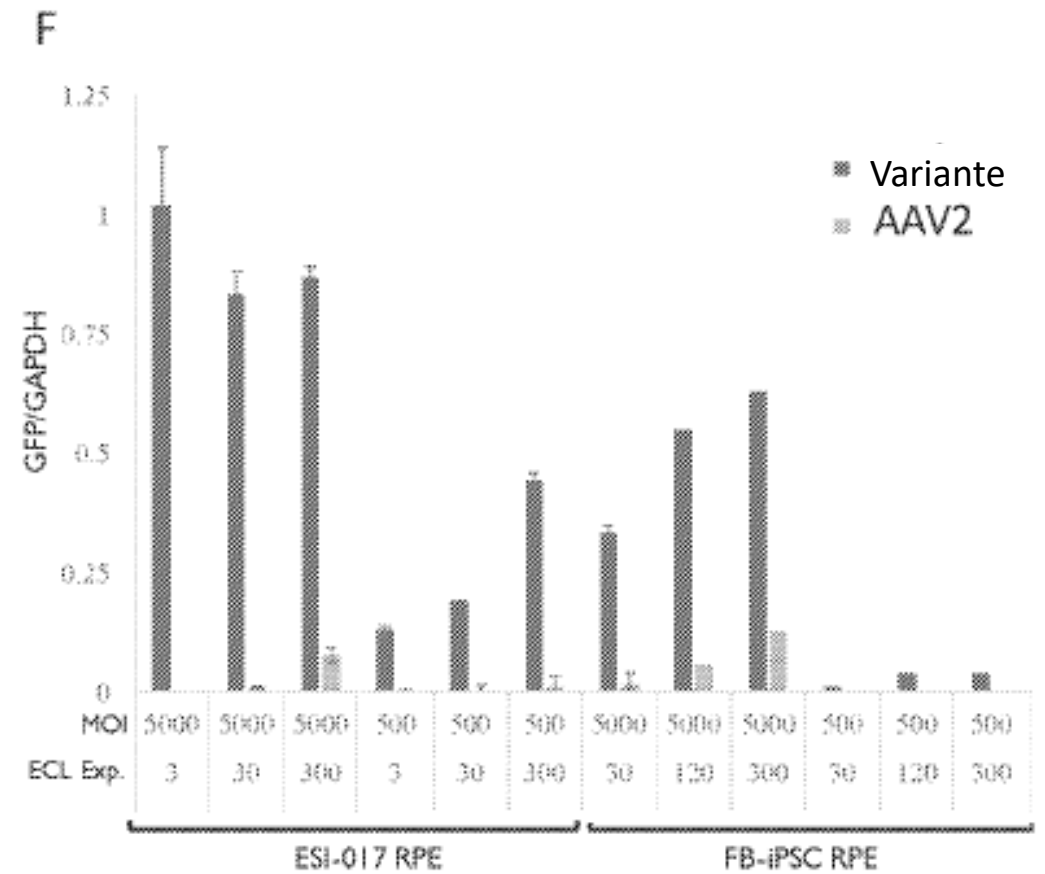


FIGURA 12A

Aflibercept



FIGURA 12B

sc-Ranibizumab LH

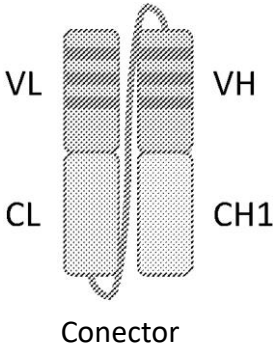


FIGURA 12C

sc-Ranibizumab HL

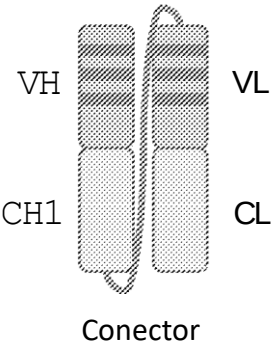


FIGURA 12D

Brolucizumab

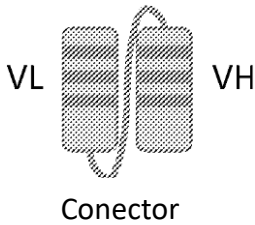


FIGURA 12E sc-Ranibizumab-Fc

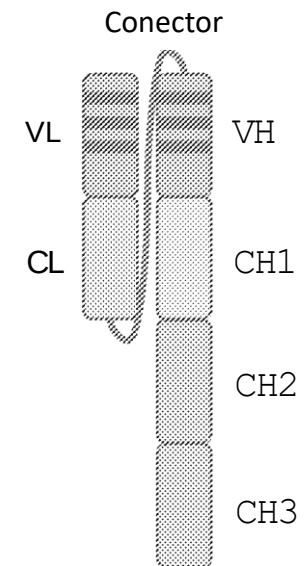


FIGURA 12F Brolucizumab-Fc

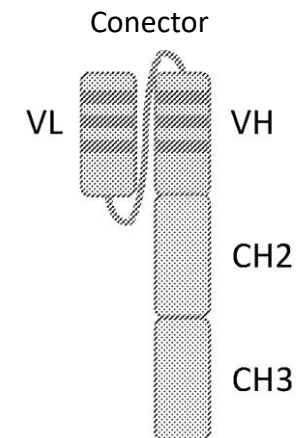


FIGURA 13A

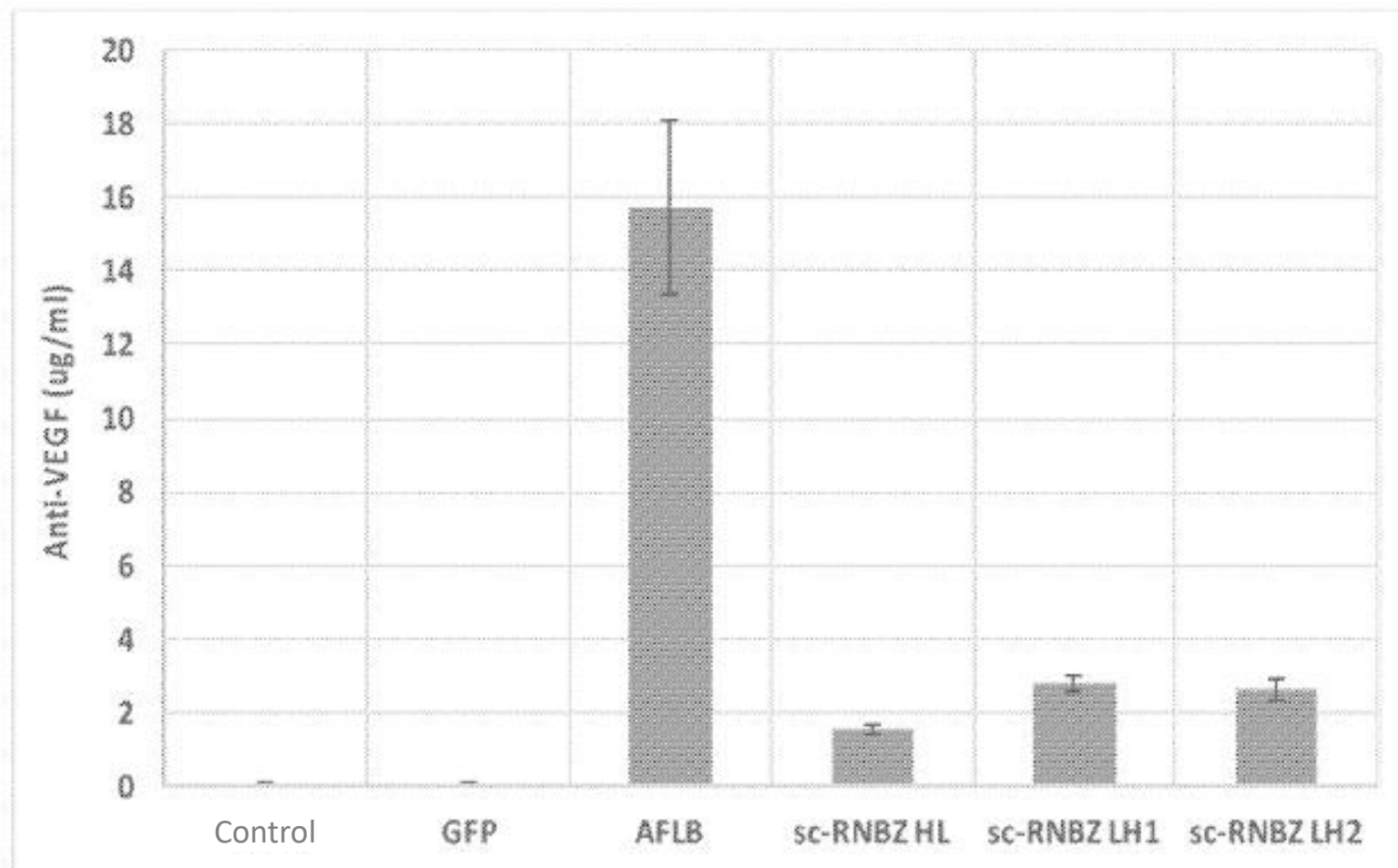


FIGURA 13B

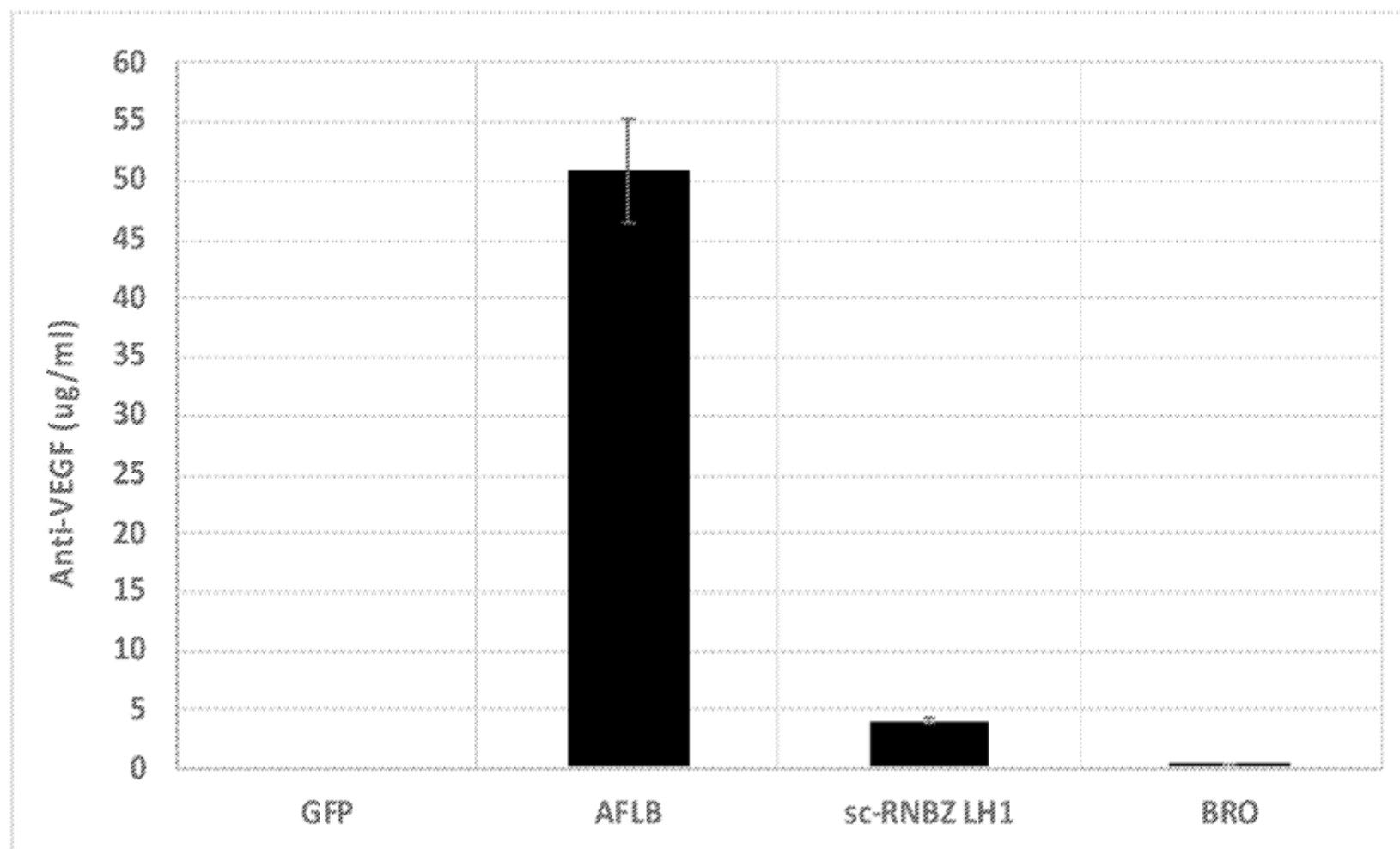


FIGURA 14A

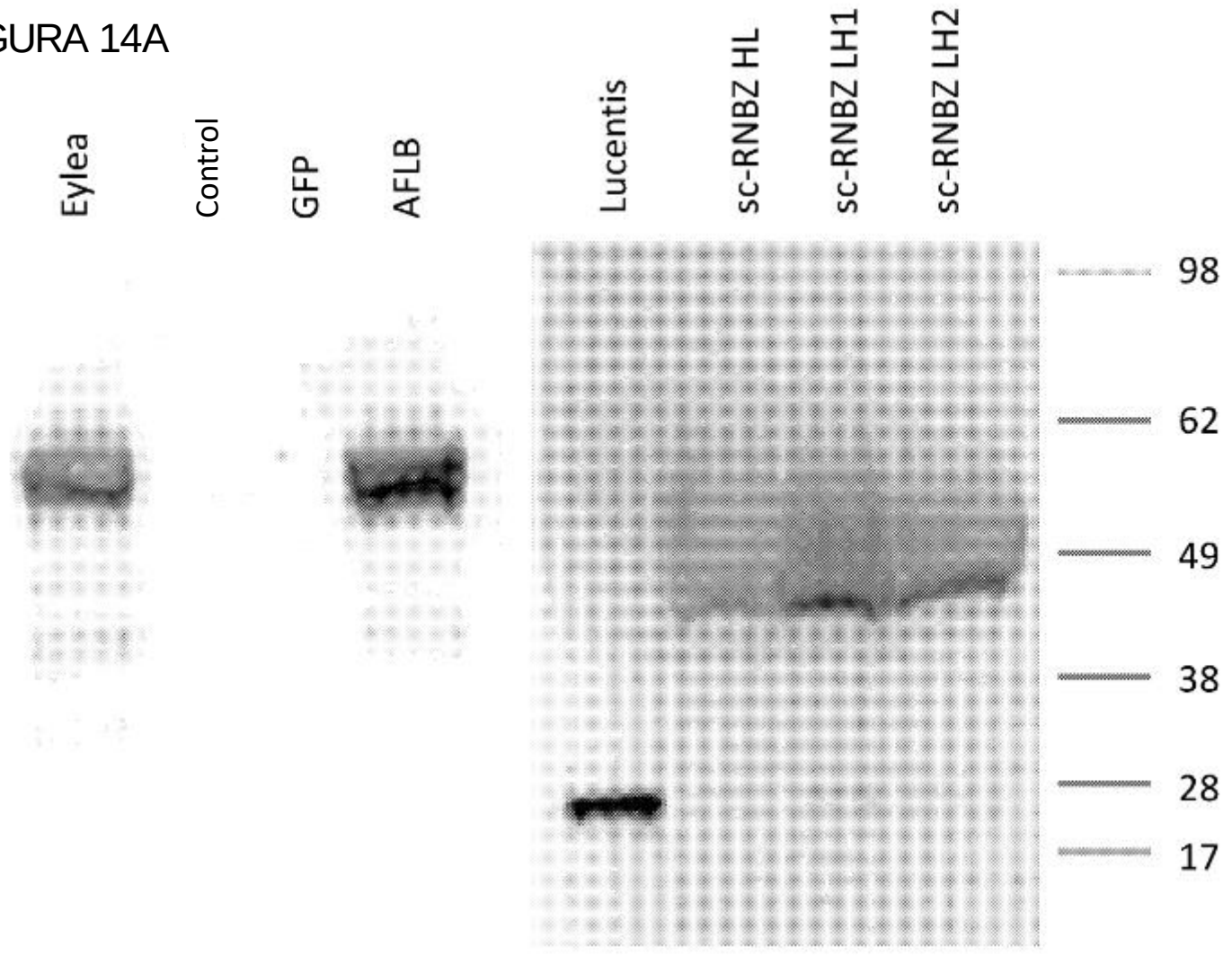


FIGURA 14B

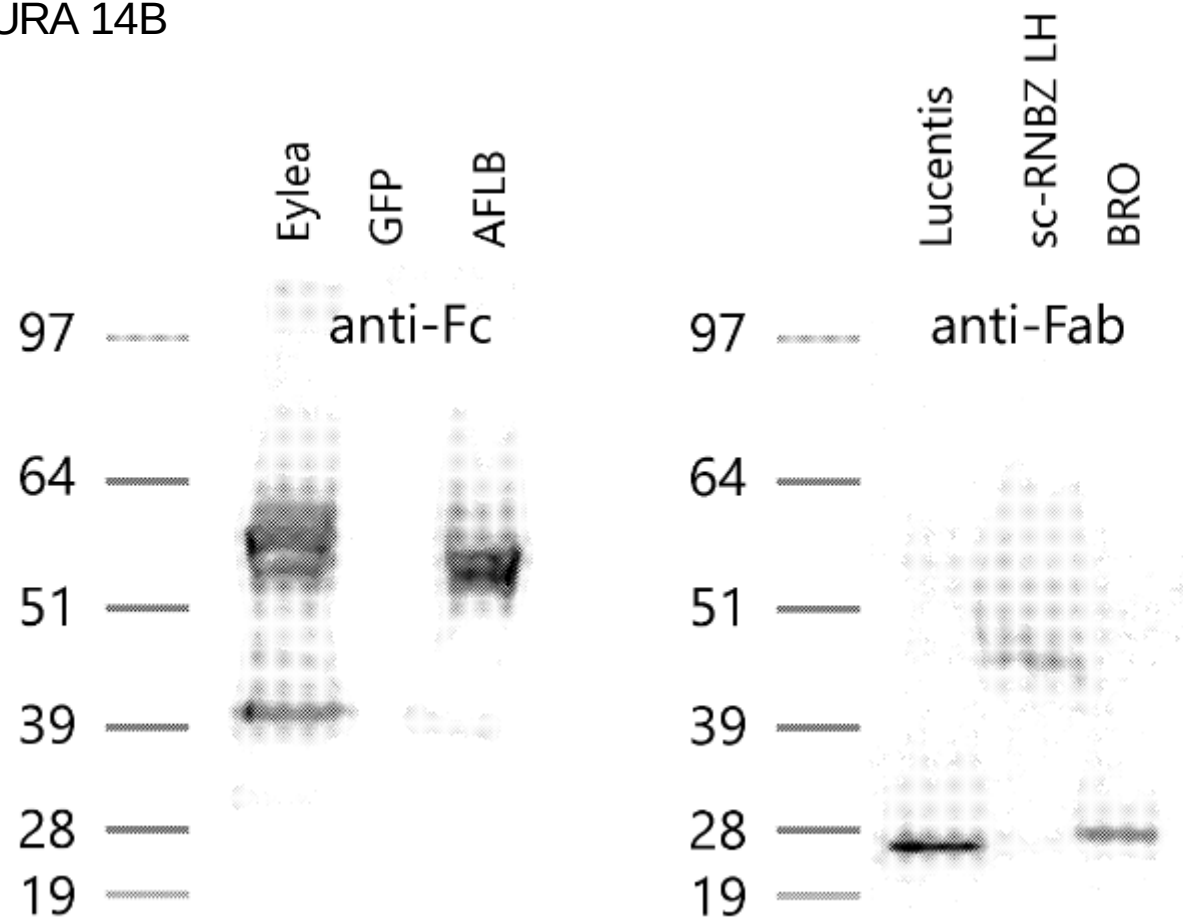


FIGURA 15B

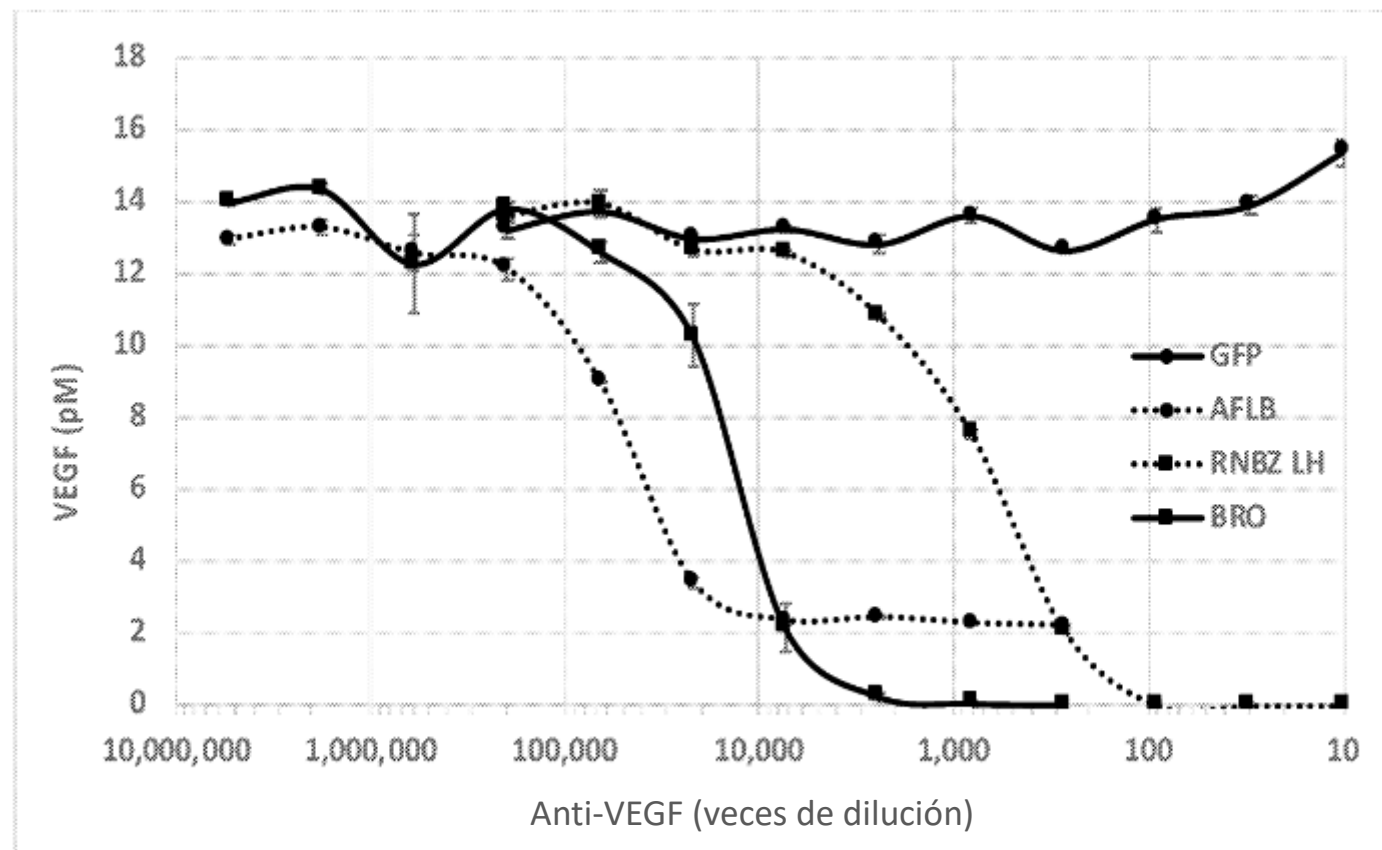


FIGURA 16

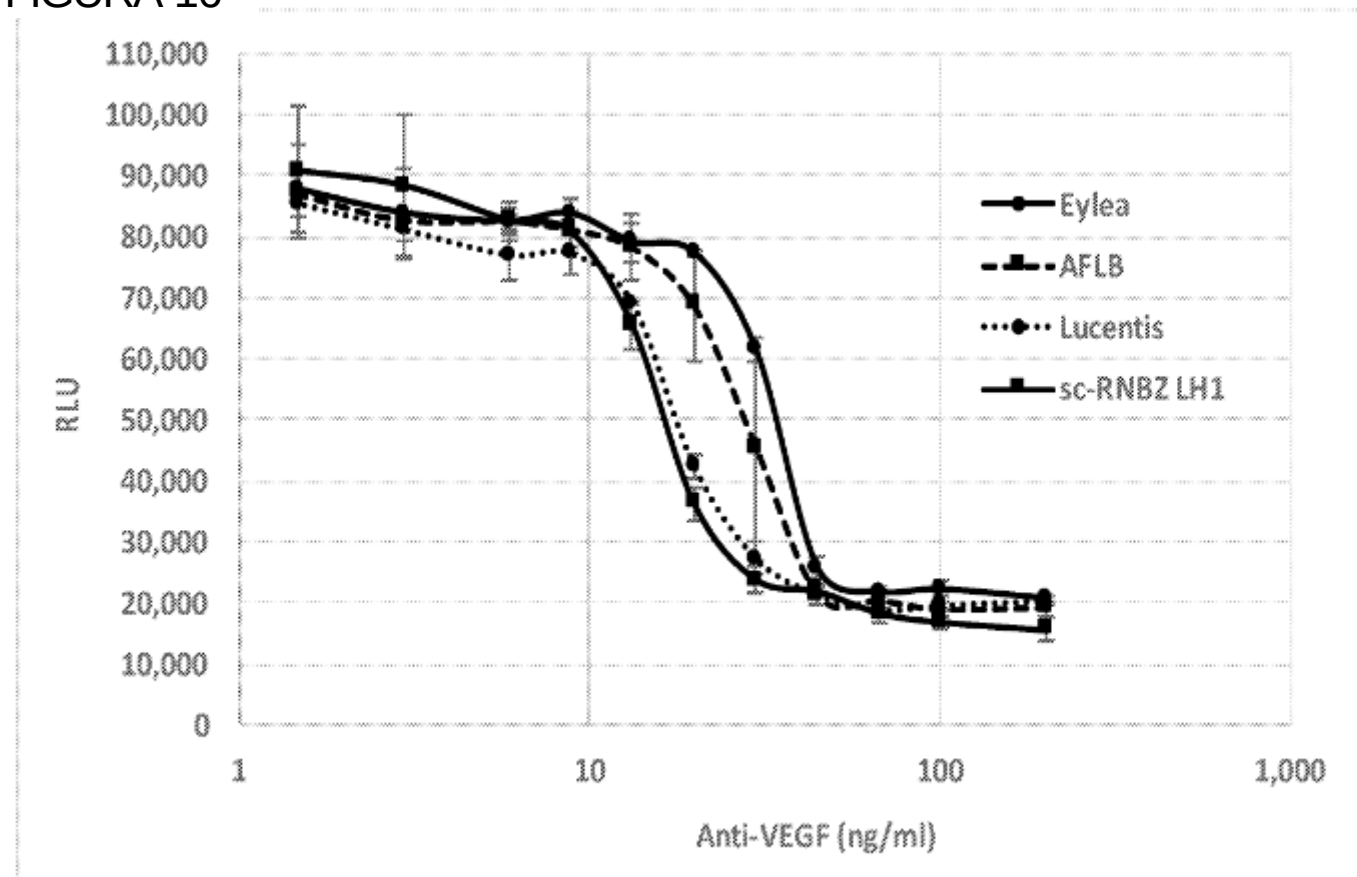


FIGURA 17A

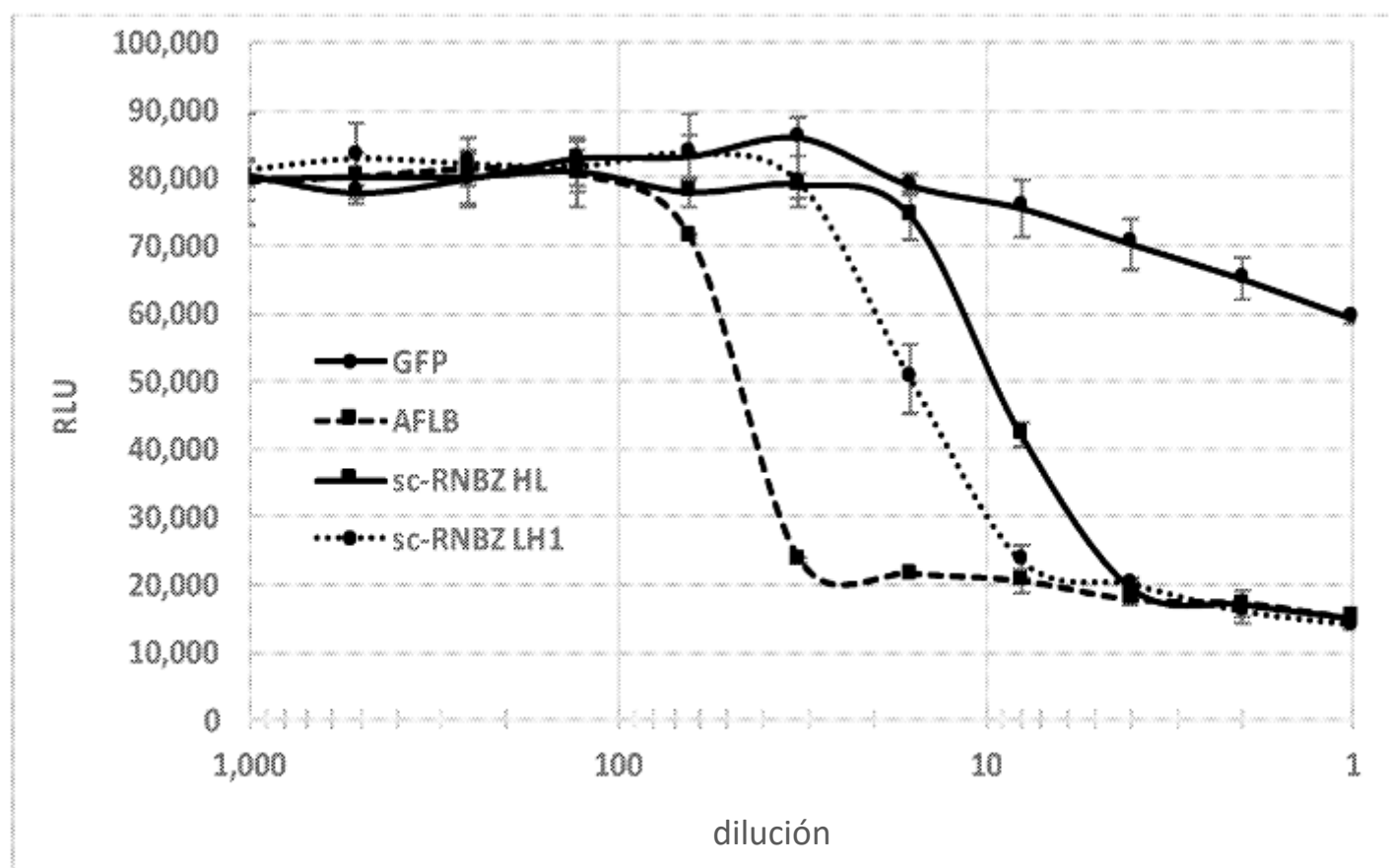


FIGURA 17B

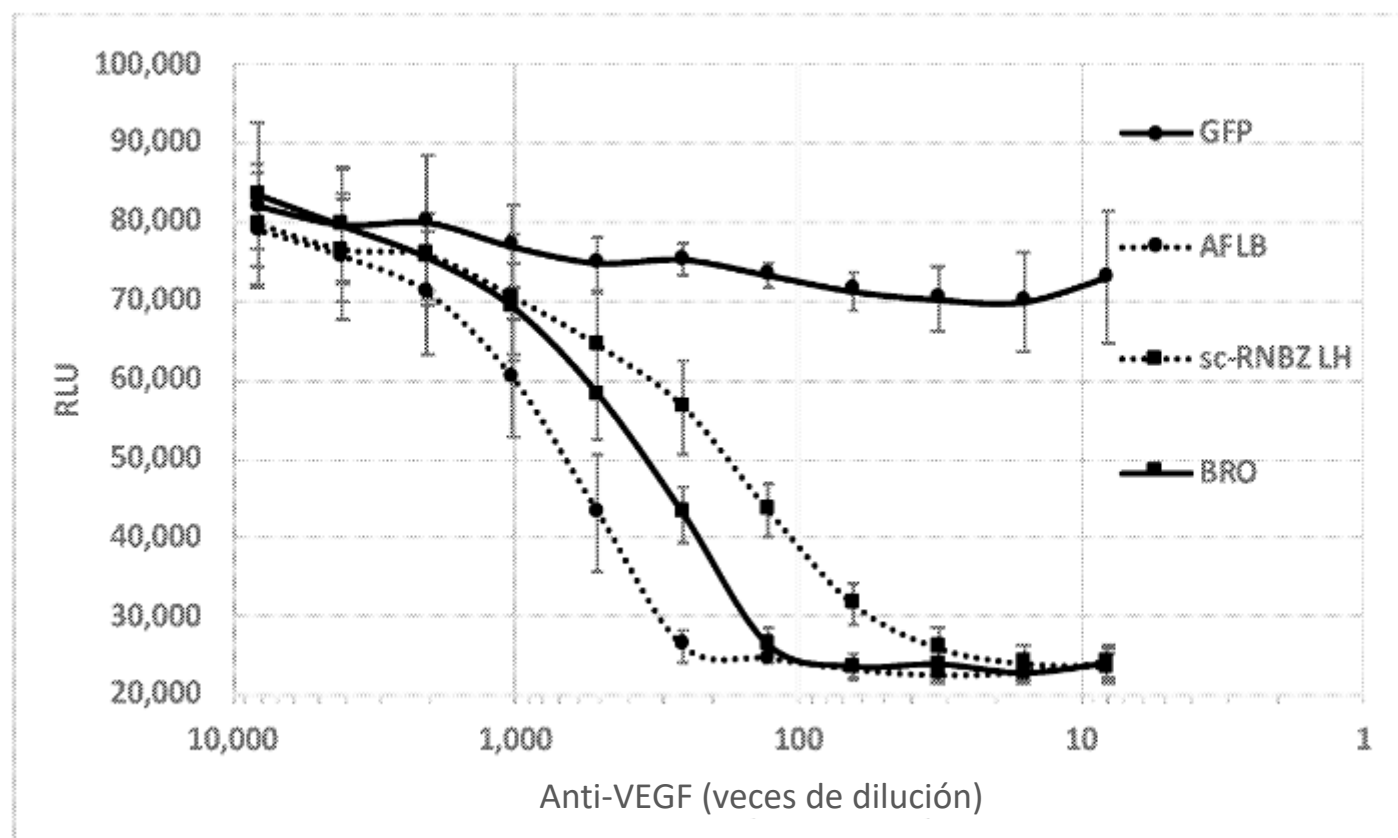


FIGURA 18

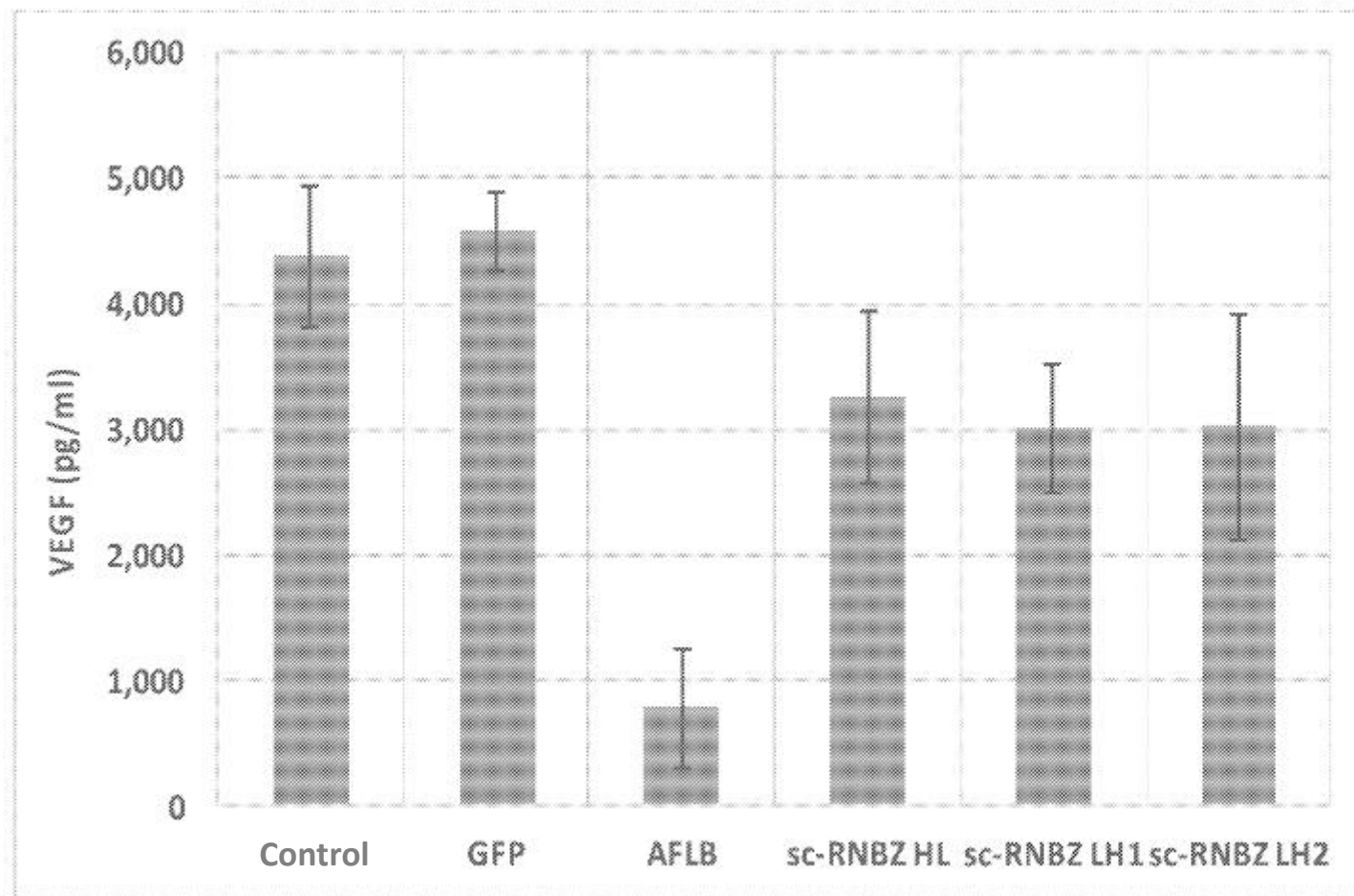


FIGURA 19

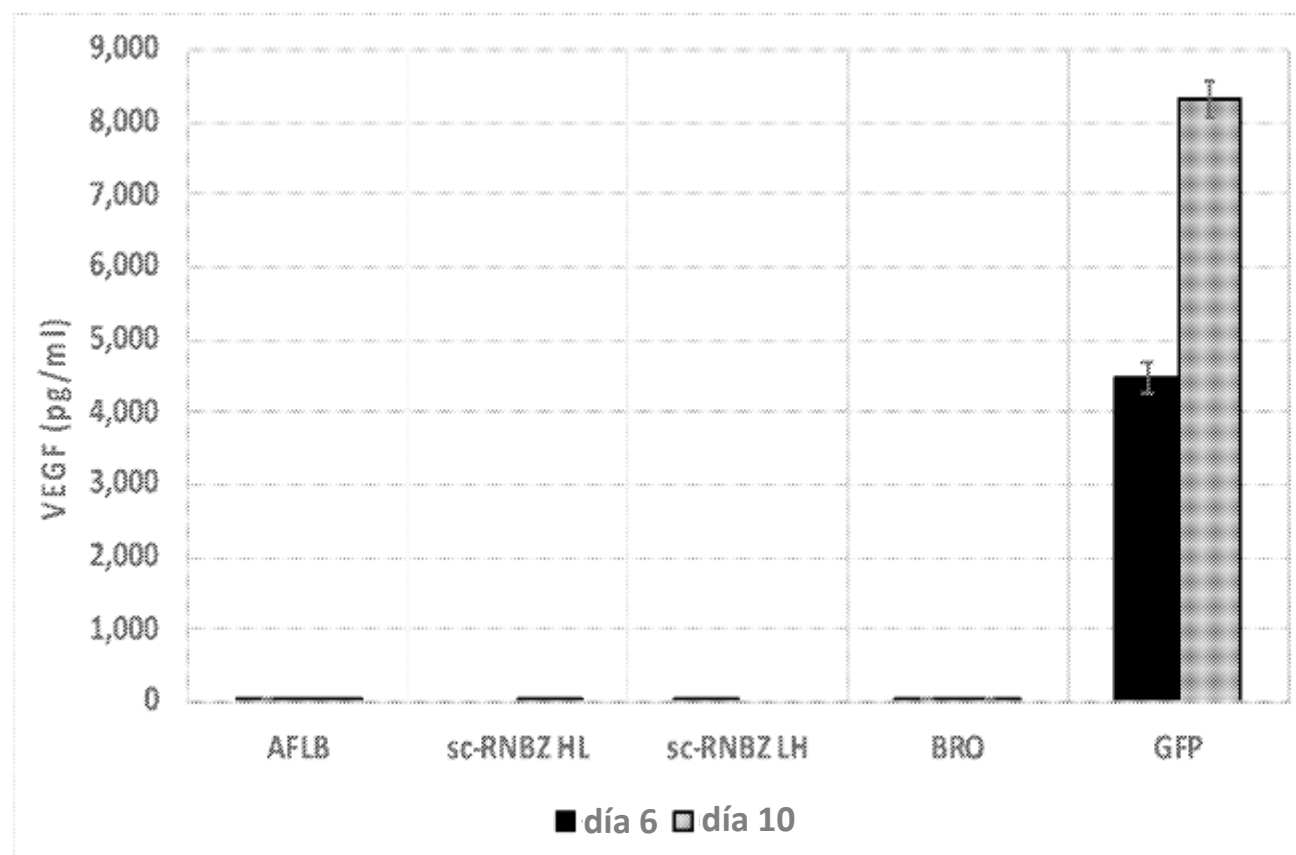


FIGURA 20

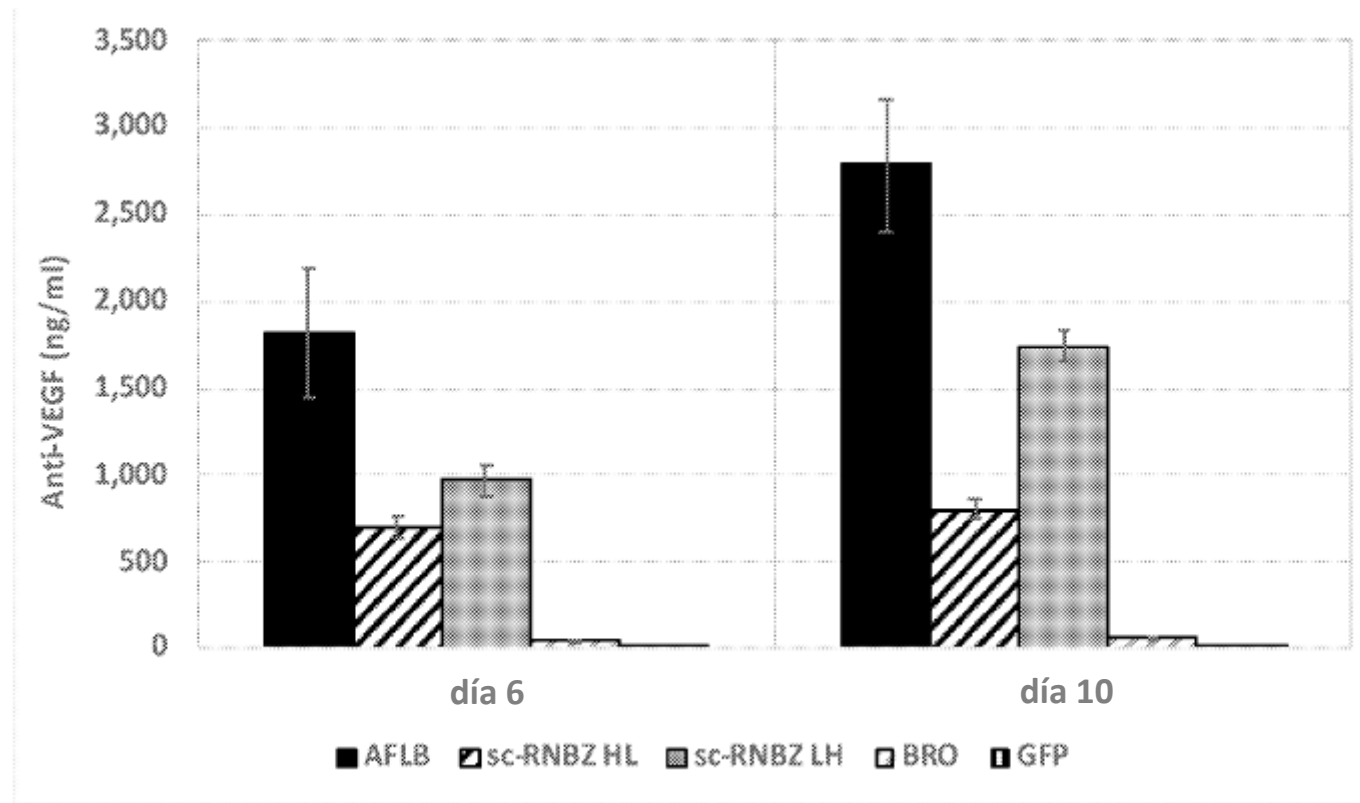


FIGURA 21

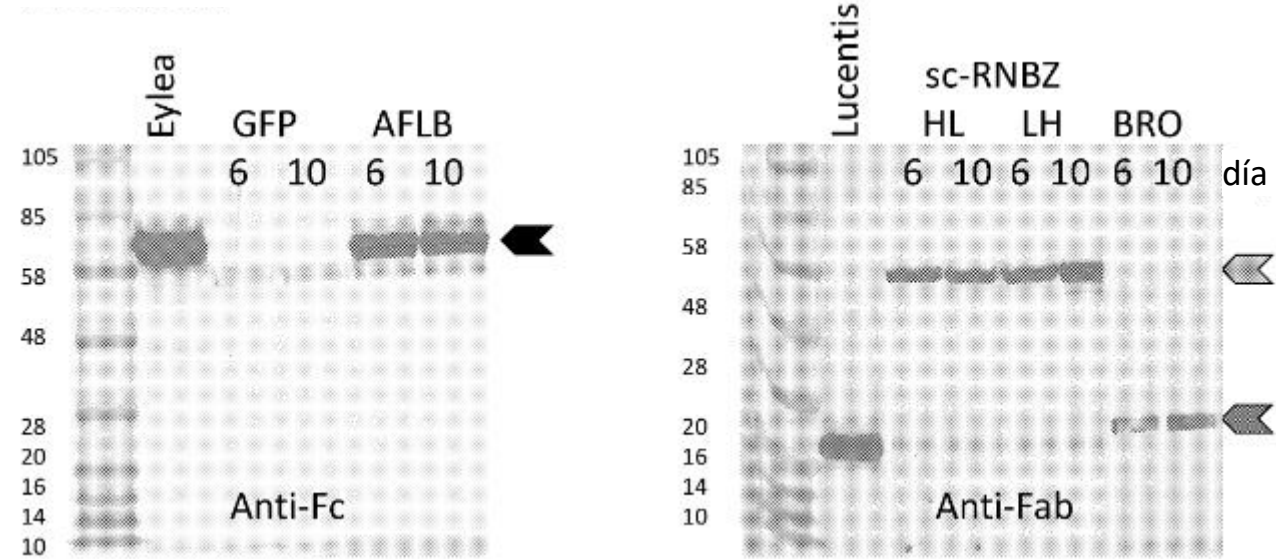
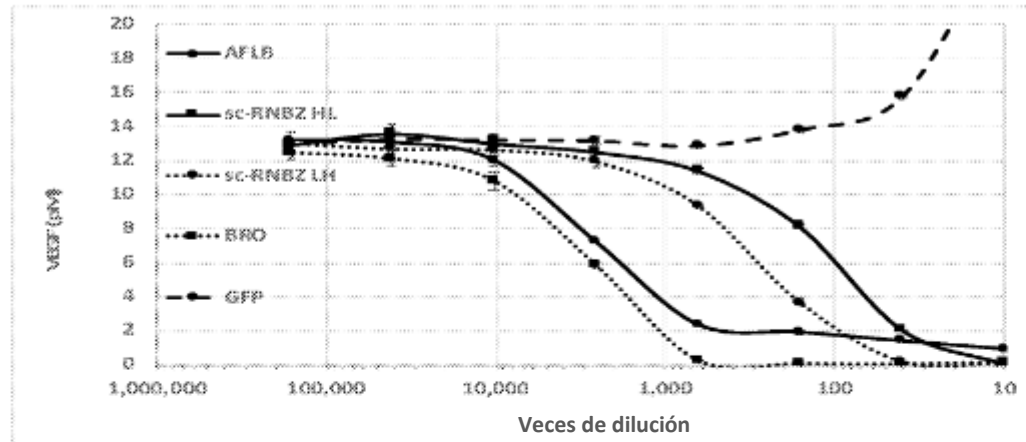


FIGURA 22

día 6



día 10

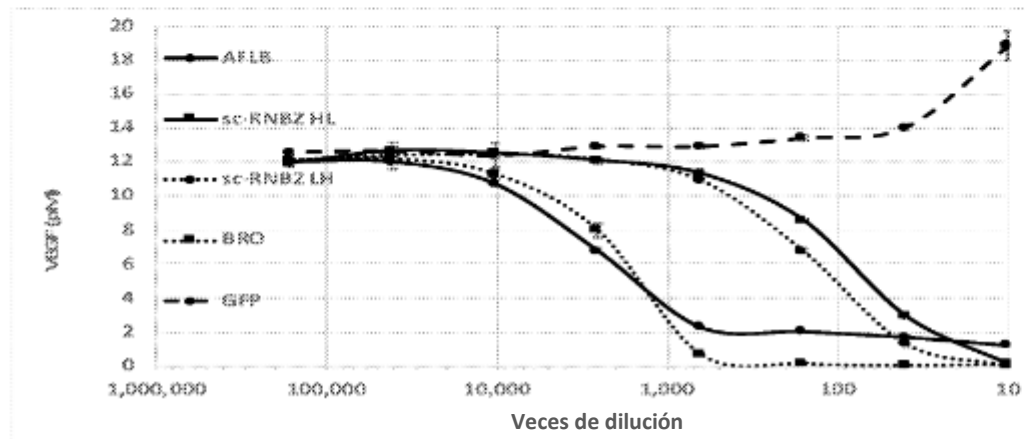


FIGURA 23

