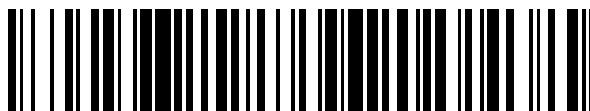


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 502**

51 Int. Cl.:

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

C07K 14/015 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.02.2014** **PCT/US2014/015340**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2014** **WO14124282**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.02.2014** **E 14749120 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019** **EP 2954051**

54 Título: **Cápside de AAV8 modificada para la transferencia génica para terapias de retina**

30 Prioridad:

08.02.2013 US 201361762775 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.02.2020

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 Chestnut Street Suite 200
Philadelphia, PA 19104, US**

72 Inventor/es:

**CRONIN, THERESE;
BENNETT, JEAN y
VANDENBERGHE, LUK E.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 741 502 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Cápside de AAV8 modificada para la transferencia génica para terapias de retina.

Antecedentes de la invención

- Los vectores de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) han sido fundamentales para alcanzar la restauración de la visión en humanos con amaurosis congénita de Leber debido a las mutaciones RPE65 y en un número de modelos animales (revisado por Stieger, K. et al., Adeno-associated virus mediated gene therapy for retinal degenerative diseases. *Methods Mol Biol* 807, 179-218 (2011)). Los primeros ensayos clínicos de terapia génica retiniana para la enfermedad degenerativa retiniana se iniciaron en humanos en 2007 usando AAV2 para probar la seguridad de la expresión génica terapéutica en niños y adultos con una forma temprana de ceguera denominada Amaurosis congénita de Leber. Actualmente, cinco años después, hay 7 ensayos de terapia génica en fase I/II en curso que implican la ceguera hereditaria. El primer ensayo clínico en fase III inició la inscripción en el cuarto cuarto de 2012 (<http://clinicaltrials.gov>) y los resultados hasta la fecha han sido excelentes. Más de 125 individuos han participado ya en ensayos clínicos de terapia génica mediada por AAV de genes retinianos y los registros de seguridad en estos estudios han sido excelentes.
- Dados los excelentes datos de seguridad y eficacia relacionados con la terapia génica retiniana mediada por AAV y dado el gran número de enfermedades heredadas y adquiridas que llevan a la ceguera, hay muchas dianas adicionales y estrategias que se están considerando para la aplicación a la retina. Un desafío, sin embargo, es identificar vectores que puedan transducir de forma eficiente y estable a una gran variedad de tipos de células retinianas. Muchos de los rAAV que se han caracterizado hasta la fecha se dirigen a células epiteliales pigmentarias de la retina (RPE) de forma eficiente, y varios de ellos se dirigen a los fotorreceptores bastones de forma eficiente. Uno (AAV2) se dirige a las células ganglionares, unos pocos se dirigen a las células de Muller (AAV2, AAV5, AAV8) y otro (AAV9) se dirige a los fotorreceptores conos. Sin embargo, se ha encontrado que pocos AAV se dirigen a la mayoría de las células oculares con alta eficiencia.
- En un ojo normal, los fotorreceptores forman la capa más externa de la retina. Convierten la luz en señales eléctricas, que se envían a las neuronas en la capa media de la retina conocidas como células bipolares. Las células bipolares envían información visual a la capa interna, constituida por células ganglionares, que conectan después al cerebro por medio del nervio óptico. En terapia optogenética, los fotorreceptores artificiales se construyen mediante inserción génica de canales o bombas activadas por la luz a los tipos de células supervivientes en el circuito retiniano que queda. Debido a que las células bipolares están implicadas en el procesamiento de señales visuales, se han convertido en el foco de atención de los interesados en terapias optogenéticas para la retina. Sin embargo, hasta ahora, no se han identificado un virus recombinante que se transduzca a las células bipolares de la retina.
- Las células horizontales presentan una diana interesante. Aunque, hasta la fecha, no se conocen genes específicos de las células horizontales que contribuyan a la enfermedad retiniana, 40 genes están aún no identificados de los 232 sitios que están relacionados actualmente con la enfermedad retiniana, y pueden aún descubrirse genes de la enfermedad en las células horizontales (<https://sph.uth.edu/retnet/sm-dis.htm>). Además, las células horizontales ajustan la salida de los fotorreceptores a través de las señales de retroalimentación y son cruciales para la percepción de la visión. Se necesita más información sobre las células horizontales para entender completamente la percepción visual. Por consiguiente, se necesita la capacidad para expresar transgenes deseados en estos, y otros tipos de células oculares.
- Raupp et al., (2012), *Journal of Virology*, vol. 86, núm. 17, páginas 9396-9408, describe una comparación de la transducción génica *in vivo* de rAAV2 y rAAV8 en ratones que muestra que los intercambios de aminoácidos sencillos en las protrusiones triples de AAV8 en los bucles superficiales comprendidos por los residuos 581 a 584 y 589 a 592 a los correspondientes aminoácidos de AAV2 y viceversa tenían una fuerte influencia en la eficiencia de transducción y el tropismo tisular.
- El documento WO2012/145601 describe viriones de virus adeno-asociado (AAV) con proteína de la cápside alterada, donde los viriones de AAV muestran mayor infectividad de las células retinianas, cuando se administran por medio de la inyección intravítrea, en comparación con las AAV tipo salvaje.
- Aravind, A. et. al., (2010) *Nature Biotechnology*, vol. 28, núm. 1, 1087-0156, páginas 79-82, describe la generación de un panel de vectores AAV2 sintéticos sustituyendo una secuencia hexapeptídica en una impronta del receptor de sulfato de heparano identificado anteriormente con los residuos correspondientes de otras cepas de AAV. Esto proporcionó varias cápsides quiméricas que presentan tropismo sistémico después de la administración intravenosa en ratones. Una quimera de AAV2/AAV8 presentó un perfil antigénico alterado, fácilmente atravesó la vasculatura sanguínea, y se transdujo de forma selectiva en tejidos musculares cardíaco y esquelético de todo el cuerpo con alta eficiencia.
- Shen, X. et al., (2007) *Molecular Therapy*, vol. 15, núm. 11, páginas 1955-1962, describe la generación de 27 genes de cápside quimérica que contienen dominios intercambiados entre AAV2 y AAV8. Las cápsides quiméricas resultantes se usaron entonces para empaquetar los genomas de AAV con un casete de expresión del factor de coagulación humano IX (hFIX) específico del hígado. Comparando las eficiencias de transducción entre los vectores

pseudotipados con cápsides AAV2 y AAV8, quiméricas, se encontró que la transducción hepática más eficiente alcanzada por AAV8 estaba estrechamente relacionada con los componentes de su dominio de Bucle IV entre hebras, particularmente los sub-bucles 1 y 4.

5 El documento WO2012/051599 describe composiciones y métodos para el diseño de secuencias reguladoras sintéticas y para la modulación posterior de rutas neurales.

El documento WO2010/011404 describe composiciones y métodos para el tratamiento génico y específico del circuito y no específico de la etiología de las enfermedades, utilizando vectores para la distribución de proteínas sensibles a la luz a células y tejidos enfermos y normales de interés.

Compendio de la invención

10 La invención se define en las reivindicaciones añadidas.

Se describe una proteína de cápside de AAV recombinante. La proteína de la cápside de AAV se caracteriza por una mutación en los aa 587-595 en comparación con la secuencia de la cápside AAV8 tipo salvaje, o una mutación en la región análoga de otra cápside de AAV en comparación con la correspondiente secuencia de la cápside tipo salvaje de AAV. En un aspecto, la proteína de la cápside de AAV se caracteriza por una mutación en los nt 1759-1785 de la secuencia que codifica la proteína de la cápside de AAV8 en comparación con la secuencia tipo salvaje de AAV8, o una mutación en la región análoga de la secuencia que codifica otra cápside de AAV en comparación con la correspondiente secuencia de la cápside tipo salvaje de AAV. En otro aspecto, la proteína de la cápside de AAV recombinante se caracteriza por al menos una mutación en el bucle HI en comparación con la secuencia de tipo salvaje. En otro aspecto, la proteína de la cápside de AAV recombinante comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.
20 En una realización, la proteína de la cápside de AAV recombinante comprende SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

Se describen también secuencias de ácidos nucleicos que se proporcionan que codifican cualquiera de las proteínas de la cápside de AAV recombinante como se describe en la presente memoria.

Se describe unos virus adeno-asociados (AAV) recombinantes. En un aspecto, el AAV tiene una cápside de AAV recombinante que tiene una mutación en los aa 587-595 de la secuencia de proteína de la cápside de AAV8 en comparación con la secuencia de la cápside de tipo salvaje de AAV8 o una mutación en una región correspondiente de otra proteína de la cápside de AAV en comparación con la correspondiente secuencia de la cápside tipo salvaje. El AAV además tiene un mini-gen que tiene repeticiones terminales invertidas de AAV y una secuencia de ácido nucleico heterólogo unido de forma operable a secuencias reguladoras que dirigen la expresión de un producto codificado mediante la secuencia de ácido nucleico heterólogo en una célula o tejido diana. En un aspecto, el AAV
30 tiene una proteína de la cápside que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En una realización, el AAV tiene una proteína de la cápside que tenía la secuencia de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

Se describe además un método para prevenir, detener la progresión de, o mejorar la pérdida de visión asociada con un trastorno ocular en un sujeto. El método incluye administrar al sujeto una concentración efectiva de una composición que comprende cualquiera de los virus adeno-asociados (AAV) recombinantes como se describe en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
35

Se describe además un método de direccionamiento a las células bipolares para la terapia optogenética en un sujeto que lo necesita. El método incluye administrar al sujeto una concentración efectiva de una composición que comprende cualquiera de los virus adeno-asociados (AAV) recombinantes descritos en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 Se describe además un método de direccionamiento a uno o más tipos de células oculares para la terapia optogenética en un sujeto que lo necesita. El método incluye administrar al sujeto una concentración efectiva de una composición que comprende cualquiera de los virus adeno-asociados (AAV) recombinantes descritos en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Se describe además un método para el direccionamiento a uno o más tipos de células oculares para la terapia de aumento génico en un sujeto que lo necesita. El método incluye administrar al sujeto una concentración efectiva de una composición que comprende cualquiera de los virus adeno-asociados (AAV) recombinantes descritos en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
45

Se describe aún adicionalmente un método de direccionamiento a uno o más tipos de células oculares para la terapia de supresión génica en un sujeto que lo necesita. El método incluye administrar al sujeto una concentración efectiva de una composición que comprende cualquiera de los virus adeno-asociados (AAV) recombinantes descritos en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
50

Se describe además un método de direccionamiento a uno o más tipos de células oculares para la terapia de desactivación/aumento génico en un sujeto que lo necesita. El método incluye administrar al sujeto una concentración efectiva de una composición que comprende cualquiera de los virus adeno-asociados (AAV) recombinantes descritos en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
55

Se describe además un método de direccionamiento a uno o más tipos de células oculares para la terapia de corrección génica en un sujeto que lo necesita. El método incluye administrar al sujeto una concentración efectiva de una composición que comprende cualquiera de los virus adeno-asociados (AAV) recombinantes descritos en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 Se describe aún adicionalmente un método de direccionamiento a uno o más tipos de células oculares para la terapia génica del factor neurotrófico en un sujeto que lo necesita. El método incluye administrar al sujeto una concentración efectiva de una composición que comprende cualquiera de los virus adeno-asociados (AAV) recombinantes descritos en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 10 Se describe además un método de direccionamiento a todas las células oculares para la terapia optogenética en un sujeto que lo necesita. El método incluye administrar al sujeto una concentración efectiva de una composición que comprende cualquiera de los virus adeno-asociados (AAV) recombinantes descritos en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 15 Se describe además un método de generación de un virus adeno-asociado recombinante (rAAV) que tiene una cápside de AAV. El método incluye las etapas de cultivar una célula huésped que contiene: (a) una molécula que codifica una proteína de cápside de AAV como se describe en la presente memoria; (b) un gen rep funcional; (c) un mini-gen que comprende repeticiones terminales invertidas (ITR) del AAV y una secuencia de ácido nucleico heterólogo unida de forma operable a secuencias reguladoras que dirigen la expresión de un producto codificado por la secuencia de ácido nucleico heterólogo en una célula diana; y (d) funciones de ayuda suficientes para permitir el empaquetado del mini-gen en la proteína de la cápside de AAV.

- 20 Se describe además una célula huésped o diana transfectada con un AAV o molécula de ácido nucleico como se describe en la presente memoria.

Se describe además una composición que se proporciona que comprende un AAV como se describe en la presente memoria y un vehículo fisiológicamente compatible.

- 25 Se describe además un método que se proporciona de distribución de un transgén a una célula. El método incluye la etapa de poner en contacto la célula con un AAV según como se describe en la presente memoria, en el que dicho AAV comprende el mini-gen.

Se describe aún adicionalmente el uso del AAV o una molécula de ácido nucleico como se describe en la presente memoria que se proporciona para preparar un medicamento para la distribución de una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica el producto a una célula.

- 30 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un alineamiento de la proteína de la cápside proteína variable 1 (vp1) para AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV6, AAV7 y AAV8 tomada de Gao G et al., PNAS, septiembre de 2002; 99:11854-11859. La región de mutación (aa 587-595 de la secuencia ts de AAV8) está encerrada en una caja.

- 35 La Figura 2 muestra la estructura de proteína de la proteína de la cápside AAV8 tomada de Nam, H.J. et al. (2007) J. Virol. 81:12260-12271. El bucle HI (o, de forma alternativa GH), que es el sujeto de mutación en esta descripción, está encerrado en un círculo.

La Figura 3 es un mapa del plásmido p-Red-Caps-Relleno usado para la producción de la biblioteca tratada en el Ejemplo 1.

- 40 La Figura 4 muestra los resultados de la clasificación FACS descritos en el Ejemplo 2. El cuadrante superior derecho corresponde a células bipolares ON transfectadas con AAV. El cuadrante superior izquierdo corresponde a todas las células no bipolares transfectadas con AAV.

- 45 La Figura 5 muestra las secuencias de los aa 587-595 de las 5 variantes "doble positivas" secuenciadas como se trata en el Ejemplo 2. La secuencia tipo salvaje de AAV8 se sustituyó con cada una de las secuencias variantes. La línea superior de cada secuencia muestra la secuencia de codificación de ADN, la fila media muestra el aminoácido correspondiente y la fila de abajo proporciona información respecto a las características del aminoácido. P = polar, N = no polar, A = ácido, B = básico, * = muy hidrófobo, y ^ = hidrófilo. La variante 5 codifica un codón de parada prematuro y se usó como un control negativo. La variante 6 falló al producir AAV de alta titulación, y no se hicieron pruebas adicionales en este mutante.

- 50 La Figura 6A-E son fotografías de imágenes 20X de secciones retinianas de ratón 3 semanas después de la inyección sub-retiniana con variantes de AAV seleccionadas como se muestra en la Figura 5. Estos virus expresan EGFP bajo el promotor EF1alfa humano (promotor descrito en J Virol. Marzo 2005; 79(6):3606-14). La variante 1 muestra fluorescencia en una diversa variedad de tipos de células con la fluorescencia más escasa entre las capas plexiformes externa (OPL) e interna (IPL) donde se encuentran los subtipos de células bipolares (Fig. 6A). Esta estratificación se identifica usando un marcador para acetilcolina transferasa (anti-ChAT). El patrón de transducción

para la variante 1 es cualitativamente similar al visto con la cápside de AAV8 tipo salvaje. En contraste se encuentra una fuerte tinción de fluorescencia para la variante 2 (AAV8b) en la región plexiforme externa-interna (Fig. 6B, mostrada por una flecha) con muchas células bipolares y amacrinas teñidas. La tinción de células bipolares se identifica aquí con el marcador anti-PKC α . Además los cuerpos celulares del fotorreceptor en la capa nuclear externa y sus segmentos externos están fuertemente teñidos. El virus de la variante 3 muestra un patrón de tinción más distintivo con tinción densa a lo largo de la capa plexiforme externa con marcado de los cuerpos celulares horizontales y su densa red de dendritas en propagación (Fig. 6C, mostrada por una flecha). La falta de tinción en la capa nuclear externa sugiere que esta variante se selecciona frente a la transducción de las células de fotorreceptor. La tinción de la variante 4 es escasa con solo unas pocas células horizontales y amacrinas marcadas (Fig. 6D). La variante 5 era un control negativo (Fig. 6E). POS = segmentos externos del fotorreceptor, ONL = capa nuclear externa, OPL = capa plexiforme externa, IPL = capa plexiforme interna, GCL = capa celular ganglionar.

La Figura 7 son dos fotografías de imágenes 20X de secciones de la retina de ratón 3 semanas después de la inyección sub-retiniana con o AAV8wt-EF1 α -EGFP (izquierda) o AAV8-b-EF1 α -EGFP (derecha). Las diversas secciones retinianas se marcan. Las abreviaturas las mismas que en la Fig. 6. La tinción de fluorescencia muestra una fuerte transducción de la membrana de Bruch y la membrana limitante interna de la retina del ratón por AAV8wt-EF1 α -EGFP. Estas membranas no son fluorescentes en las retinas transducidas con AAV8b-EF1 α -EGFP. Esto puede explicar la mayor difusión del virus AAV8b a través de la retina con fluorescencia más fuerte en la región entre las capas plexiformes interna y externa para AAV8b en comparación con AAV8wt. Notar que estas retinas se marcaron también para acetilcolina transferasa para identificar la región entre las capas plexiformes interna y externa.

La Figura 8 es una fotografía del fondo del ojo canino que había recibido una inyección sub-retiniana de AAV8-b. La foto se tomó 22 días después de la inyección. La vista muestra la mitad tapetal de la retina. Cabezas de flecha negras demarcan la región de la retina que es EGFP-positiva debido a la exposición al virus AAV8-b. La cabeza de flecha blanca indica el sitio de retinotomía. El disco óptico está en la parte inferior de la imagen.

Las Figuras 9A y B son fotografías que muestran una sección de la retina canina de la región GFP-positiva mostrada en la Figura 8, vista con microscopio de fluorescencia. Los núcleos se contratiñen con DAPI y aparecen azules. La Fig. 9A muestra fotorreceptores como fuertemente GFP-positivos, células retinianas internas y células ganglionares. Se aprecia que las células nucleares y ganglionares internas positivas adicionales tienen expresión de GFP menos intensa. La ONL es del mismo espesor que la de la retina no tratada, demostrando que no hay cambios degenerativos retinianos. Hay pocas si hay alguna, células RPE GFP-positivas. RPE, epitelio del pigmento retiniano, ONL, capa nuclear externa; INL, capa nuclear interna; GCL, capa celular ganglionar. La Fig. 9B es una vista de mayor ampliación de la imagen mostrada en la Fig. 9A. Los fotorreceptores como fuertemente GFP positivos son evidentes además de unos pocos fotorreceptores bastón GFP-positivos. Las células retinianas internas GFP-positivas son también evidentes.

La Figura 10 es una fotografía que muestra una sección a través de la retina inyectada de forma intravítrea en la región del nervio óptico, vista con microscopio de fluorescencia. Los núcleos se contratiñen con DAPI. Los axones de células ganglionares fuertemente GFP-positivos se aprecia que entran y atraviesan la cabeza de nervio óptico. La ONL tiene espesor normal, demostrando que no hay cambios degenerativos retinianos. No hay otras células GFP-positivas en la retina con la potencial excepción de algunas células RPE en la unión del nervio óptico. Se anota que esto puede ser autofluorescencia, y no fluorescencia específica a GFP, sin embargo. Las abreviaturas, son las mismas que en la Fig. 9.

Figura 11A es una fotografía de una sección de la retina de un ratón TS inyectado de forma sub-retiniana con AAV8-b-mGluR6-ChR2-EGFP. El subtipo de célula bipolar ON se distingue de la célula bipolar OFF usando la tinción ChAT que identifica la sub-lámina específica de la capa plexiforme interna. Las células bipolares OFF terminan en la sub-lámina 1 y 2 y tienen axones más cortos que el tipo ON que termina en la sub-lámina 4 y 5. POS = segmentos externos del fotorreceptor, ONL = capa nuclear externa, OPL = capa plexiforme externa, IPL = capa plexiforme interna, GCL = capa de células ganglionares. La Fig. 11B es un diagrama que muestra la estructura de la retina interna que incluye las células bipolares y la sub-lámina de la capa plexiforme interna.

Descripción detallada de la invención

Se describen varias composiciones y métodos de tratamiento que utilizan las mismas que comprenden una concentración efectiva de un virus adeno-asociado recombinante (rAAV) caracterizado por una mutación en los aa 587-595 de la secuencia de proteína de la cápside en comparación con la secuencia de la cápside de AAV8 tipo salvaje, o una mutación en la región análoga de otra cápside de AAV en comparación con la correspondiente secuencia de la cápside tipo salvaje de AAV. Los métodos se dirigen al uso del AAV para tratar trastornos oculares y condiciones asociadas relacionadas con ellos.

A menos que se defina otra cosa, los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende normalmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención y por referencia a textos publicados, que proveen al experto en la técnica con una guía general para muchos de los términos usados en la presente solicitud. Las siguientes definiciones se proporcionan solo por claridad y no

pretenden limitar la invención reivindicada. Como se usa en la presente memoria, los términos “un” o “una”, se refiere a uno o más, por ejemplo, “una célula ocular” se entiende que representa una o más células oculares. Como tal, los términos “un” (o “una”), “uno o más” y “al menos uno” se usan de forma intercambiable en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, el término “aproximadamente” significa una variabilidad del 10% de la referencia dada, a menos que se especifique otra cosa. Aunque se presentan varias realizaciones en la memoria que usan el lenguaje “que comprende”, bajo otras circunstancias, una realización relacionada también pretende interpretarse y describirse usando el lenguaje “que consiste en” o “que consiste esencialmente en”.

Como se usa en la presente memoria, el término “células oculares” se refiere a cualquier célula en, o asociada con la función de, el ojo. El término puede referirse a cualquiera de una o más de células fotorreceptoras, que incluyen células de bastón, cono y ganglionares fotosensibles, células epiteliales pigmentarias de la retina (RPE), células de Mueller, células bipolares, células horizontales, células amacrinas. En una realización, las células oculares son células bipolares. En otra realización, las células oculares son células horizontales. En otra realización, las células oculares son células ganglionares.

Como se usa en la presente memoria, el término “sujeto mamífero” o “sujeto” incluye cualquier mamífero que necesita los métodos de tratamiento descritos en la presente memoria o profilaxis, que incluye particularmente humanos. Otros mamíferos que necesitan dicho tratamiento o profilaxis incluyen perros, gatos u otros animales domésticos, caballos, ganado, animales de laboratorio, que incluyen primates no humanos, etc. El sujeto puede ser macho o hembra.

En una realización, el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar un trastorno ocular. El término “trastorno ocular” incluye, sin limitación, retinitis pigmentosa, distrofia bastón-cono, amaurosis congénita de Leber, síndrome de Usher, Síndrome de Bardet-Biedl, enfermedad de Best, retinosquiasis, enfermedad de Stargardt (dominante autosómica o recesiva autosómica), desprendimiento de retina no tratada, distrofia en patrón, distrofia cono-bastón, acromatopsia, albinismo ocular, síndrome de cono S mejorado, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía del prematuro, retinopatía de células falciformes, ceguera nocturna estacionaria congénita, glaucoma u oclusión de la vena retiniana. En otra realización, el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar glaucoma, neuropatía óptica hereditaria de Leber, trastorno de almacenamiento lisosómico, o trastorno peroxisomal. En otra realización, el sujeto tiene necesidad de terapia optogenética.

Como se usa en la presente memoria, el término “célula huésped” puede referirse a la línea celular de empaquetado en que el rAAV se produce a partir de plásmido. En la alternativa, el término “célula huésped” puede referirse a la célula diana en que se desea la expresión del transgén.

En otra realización, el sujeto ha mostrado señales clínicas de un trastorno ocular. Las señales clínicas de un trastorno ocular incluyen, aunque no están limitados a, visión periférica disminuida, visión central (lectura) disminuida, visión nocturna disminuida, pérdida de percepción de color, reducción en la agudeza visual, función del fotorreceptor disminuida, y cambios pigmentarios. En una realización, el sujeto muestra degeneración de la capa nuclear externa (ONL). En otra realización, el sujeto se ha diagnosticado con un trastorno ocular. En aún otro aspecto, el sujeto no ha mostrado aún señales clínicas de un trastorno ocular.

En un aspecto, el sujeto se ha vuelto sintomático para el trastorno ocular. En otro aspecto, el sujeto tiene 10% o más daño/pérdida de fotorreceptor. En otro aspecto, el sujeto tiene 20% o más de daño/pérdida del fotorreceptor. En otro aspecto, el sujeto tiene 30% o más daño/pérdida del fotorreceptor. En otro aspecto, el sujeto tiene 40% o más de daño/pérdida del fotorreceptor. En otro aspecto, el sujeto tiene 50% o más de daño/pérdida del fotorreceptor. En otro aspecto, el sujeto tiene 60% o más de daño/pérdida del fotorreceptor. En otro aspecto, el sujeto tiene el 70% o más de daño/pérdida del fotorreceptor. En otro aspecto, el sujeto tiene 80% o más de daño/pérdida del fotorreceptor. En otro aspecto, el sujeto tiene 90% o más de daño/pérdida del fotorreceptor. En otro aspecto, el circuito de células bipolares del sujeto a células ganglionares y nervio óptico permanece intacto.

A. La cápside de AAV

Una proteína de la cápside de AAV recombinante como se describe en la presente memoria se caracteriza por una mutación en los aa 587-595 en comparación con la secuencia de la cápside de AAV8 de longitud completa tipo salvaje (vp1), o una mutación en la región análoga de otra cápside de AAV en comparación con la correspondiente secuencia de la cápside tipo salvaje de AAV. Un alineamiento de las secuencias de aminoácidos predichas con aminoácidos para la proteína de la cápside vp1 de AAV1, -2, -3A, -3B, -4, -6, -7 y -8 se muestra en la Fig. 1, con una caja alrededor de la región de mutación de la cápside descrita en la presente memoria (Gao G et al., PNAS, septiembre de 2002; 99:11854-11859). Esta región es relativamente homóloga a través de los serotipos de AAV, y corresponde a una región en la proteína de la cápside que está en un círculo en la Fig. 2. Este bucle se ha identificado de forma alternativa en el bucle HI (Nam, H.J. et al (2007) J. Virol. 81: 12260-12271), o el bucle GH (Asokan et al, (enero de 2010), Nat Biotechnol., 28(1): 79-82).

También se incluyen secuencias de ácido nucleico que codifican el nuevo AAV, cápsides y fragmentos de las mismas que se describen en la presente memoria. En un aspecto, la proteína de la cápside de AAV recombinante se caracteriza por una mutación en los nt 1759-1785 de la secuencia que codifica la proteína de la cápside de AAV8 en

comparación con la secuencia tipo salvaje de AAV8, o una mutación en la región análoga de la secuencia que codifica otra cápside de AAV en comparación con la correspondiente secuencia de la cápside de tipo salvaje de AAV.

Aunque, por conveniencia, se hace referencia en la presente memoria a AAV8, se va a entender que las mutaciones en la región homóloga de otras cápsides del serotipo de AAV se describen también. Como se usa en la presente memoria, el término "tipo salvaje" se refiere a la secuencia de AAV nativo sin mutación en los aa 587-595 (usando la numeración de AAV8) de la proteína de la cápside. Sin embargo no se pretende que solo el AAV que se da de forma natural sea la fuente de la secuencia de tipo salvaje. Son útiles en la presente memoria los AAV que se dan de forma no natural, que incluyen, sin limitación, AAV recombinante, modificado o alterado, quimérico, híbrido, sintético, artificial, etc. Esto incluye AAV con mutaciones en regiones de la cápside distintas de las de los aa 587-595, con tal que se usen como la "secuencia de partida" para generar la cápside mutante descrita en la presente memoria.

La cápside de AAV consiste en tres secuencias de codificación que solapan, que varían en longitud debido al uso de un codón de partida alternativo. Estas proteínas variables se denominan como VP1, VP2 y VP3, siendo VP1 la más larga y siendo VP3 la más corta. La partícula de AAV consiste en las tres proteínas de la cápside en una relación de ~1:1:10 (VP1:VP2:VP3). VP3, que está comprendida en VP1 y VP2 en el extremo N, es el componente estructural principal que construye la partícula. La proteína de la cápside puede denominarse usando varios sistemas diferentes de numeración. Por conveniencia, como se usa en la presente memoria, las secuencias de AAV se denominan usando la numeración VP1, que comienza con el aa 1 para el primer residuo de VP1. Sin embargo, las proteínas de la cápside descritas en la presente memoria incluyen VP1, VP2 y VP3 (usadas de forma intercambiable en la presente memoria con vp1, vp2 y vp3) con mutaciones en la región correspondiente de la proteína. En AAV8, las proteínas variables corresponden a VP1 (aa 1 a 738), VP2 (aa 138 a 738) y VP3 (aa 203 a 738) usando la numeración de la VP1 de longitud total. Por claridad, cuando se refiere a la mutación, significa los aa 587-595 de la VP1, aa 450-458 de la VP2 y aa 385-393 de la VP3 de AAV8, si se usa el primer aminoácido de la secuencia de la cápside vp particular como aa 1.

En una realización, AAV8 es la secuencia tipo salvaje usada cuando se genera el mutante. La secuencia de aminoácidos del AAV8 tipo salvaje se muestra como SEQ ID NO: 8. En una realización, la secuencia tipo salvaje es SEQ ID NO: 8. En otros aspectos cualquier otro serotipo de AAV es útil como la secuencia tipo salvaje de partida. En otro aspecto, la secuencia tipo salvaje de AAV es un AAV de Clado E. Un clado es un grupo de AAV que están relacionados filogenéticamente con otro como se determina usando un algoritmo de Neighbor-Joining mediante un valor de remuestreo de al menos 75% (de al menos 1000 replicados) y una medida de distancia de corrección de Poisson de no más de 0,05, en base al alineamiento de la secuencia de aminoácidos vp1 de AAV. El algoritmo de Neighbor-Joining se ha descrito de forma extensa en la bibliografía. Véase, p.ej., M. Nei y S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics* (Oxford University Press, Nueva York (2000).

El clado E se caracteriza por contener el AAV8 descrito anteriormente (G. Gao et al, PNAS, Sep 2002), 43,1/rh.2; 44,2/rh.10; rh.25; 29,3/bb.1; y 29,5/bb.2 [Solicitud de patente de EE.UU. núm. US 2003/0138772 A1 (24 de julio de 2003)]. Las secuencias de clado E adicionales se describen en la Patente de EE.UU. núm. 7.096.111. Otros AAV que son útiles como secuencias de tipo salvaje incluyen, sin limitación, que incluyen, p.ej., pi.1, pi.2, pi.3, rh.38; rh.40; rh.43; rh.49; rh.50, rh.51; rh.52; rh.53; rh.57; rh.58; rh.61; rh.64; hu.6; hu.17; hu.37; hu.39; hu.40; hu.41; hu.42; hu.66; y hu.67. Aún otros AAV que son útiles como secuencias tipo salvaje incluyen AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 y AAV9.

AAV-b

Como se muestra en los ejemplos posteriores, los inventores han mostrado que el AAV denominado AAV-b transduce de forma efectiva células bipolares, ganglionares y otras células oculares. Además, un beneficio primario de AAV-b es su fortaleza. La inyección de AAV-b da por resultado la transducción eficiente y de comienzo temprano de fotorreceptores del cono, células retinianas internas y células ganglionares. Se anotó que AAV8-b se dirige a los fotorreceptores cono y las células bipolares de forma extremadamente eficiente. Además, AAV-b es capaz de transducir estas células usando un título relativamente bajo del virus. Un beneficio reconocido adicional de AAV-b es el comienzo temprano de la expresión génica en algunos tejidos.

El AAV-b comprende la secuencia de aminoácidos de Pro-Glu-Arg-Thr-Ala-Met-Ser-Leu-Pro (SEQ ID NO: 1) en posiciones de aminoácidos 587-595. En un aspecto, se proporciona una cápside que comprende SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, la proteína de la cápside comprende SEQ ID NO: 1 en los aa 587-595 de la proteína de la cápside de AAV8 o en una región correspondiente de otra secuencia de la cápside de AAV. En una realización, la proteína de la cápside comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3. En esta realización, la secuencia de la cápside se denomina como AAV-8b. En otros aspectos, la secuencia de la cápside se deriva de otra secuencia de tipo salvaje, aunque sustituye la secuencia en la región correspondiente de los aa 587-595 con SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, se proporcionan las secuencias de ácido nucleico que codifican los virus AAV-b, las cápsides y los fragmentos descritos en la presente memoria. En un aspecto, se proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de nt 1759-CCT GAG CGG ACG GCG ATG AGT CTT CCG-1785 (SEQ ID NO: 9). En un aspecto, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 9. En otro aspecto, se proporciona una

secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9 en los nt 1759-1785 de la secuencia que codifica el AAV8 de tipo salvaje, o en una región correspondiente de otra secuencia que codifica otra cápside de AAV. En una realización, la secuencia que codifica la proteína de la cápside es SEQ ID NO: 5. En esta realización, la secuencia de la cápside se denomina como AAV-8b.

5 AAV-h

Como se muestra en los ejemplos en la presente invención, los inventores han mostrado que el AAV denominado AAV-h transduce de forma efectiva células oculares horizontales, y otras. AAV-h tiene una secuencia de aminoácidos de 587-Ser-Phe-Ser-Arg-Ala-Val-Leu-Cys-Asp-595 (SEQ ID NO: 2). En un aspecto, se proporciona una cápside que comprende SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la proteína de la cápside comprende SEQ ID NO: 2 en los aa 587-595 de la proteína de la cápside de AAV8 o en una región correspondiente de otra secuencia de la cápside de AAV. En una realización, la proteína de la cápside tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En esta realización, la secuencia de la cápside se denomina como AAV-8h. En otros aspectos, la secuencia de la cápside se deriva de otra secuencia de tipo salvaje, pero sustituye la secuencia en la región correspondiente de los aa 587-595 con la SEQ ID NO: 2.

En otro aspecto, se proporcionan secuencias de ácido nucleico que codifican los virus AAV-h, las cápsides y los fragmentos descritos en la presente memoria. En un aspecto, se proporciona un polinucleótido que comprende la secuencia de nt 1759-AGT TTT AGT CGT GCG GTT CTT TGT GAT-1785 (SEQ ID NO: 10). En otro aspecto, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside, que comprende la secuencia SEQ ID NO: 10 en los nt 1759-1785 de la secuencia que codifica el AAV8 de tipo salvaje, o en una región correspondiente de otra secuencia que codifica otra cápside de AAV. En una realización, la secuencia que codifica la proteína de la cápside es la SEQ ID NO: 6. En esta realización, la secuencia de la cápside se denomina como AAV-8h.

B. Vectores de rAAV y composiciones

Se describen en la presente memoria moléculas que utilizan las secuencias de AAV descritas en la presente memoria, que incluyen fragmentos de las mismas, para la producción de vectores virales útiles en la distribución de un gen heterólogo u otras secuencias de ácido nucleico a una célula diana. Los vectores útiles en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria contienen, como mínimo, secuencias que codifican una cápside de AAV seleccionada como se describe en la presente memoria, p.ej., una cápside de AAVb o AAVh, o un fragmento de la misma. En otro aspecto, los vectores útiles contienen, como mínimo, secuencias que codifican una proteína rep de serotipo de AAV seleccionada, p.ej., proteína rep de AAV8, o un fragmento de la misma. Opcionalmente, dichos vectores pueden contener proteínas tanto cap como rep de AAV. En vectores en que se proporcionan tanto rep como cap de AAV, las secuencias rep de AAV y cap de AAV pueden ser ambas de origen de un serotipo, p.ej., todas de origen de AAV8. De forma alternativa, pueden usarse vectores en que las secuencias rep son de un AAV que difiere del AAV tipo salvaje que proporciona las secuencias cap. En un aspecto, las secuencias rep y cap se expresan a partir de fuentes separadas (p.ej., vectores separados, o una célula huésped y un vector). En otro aspecto, estas secuencias rep se condensan en una estructura con las secuencias cap de un serotipo de AAV diferente para formar un vector de AAV quimérico, tal como AAV2/8 descrito en la Patente de EE.UU. núm. 7.282.199. Opcionalmente, los vectores contienen además un mini-gen que comprende un transgén seleccionado que está flanqueado por ITR 5' de AAV e ITR 3' de AAV. En otro aspecto, el AAV es un AAV auto-complementario (ac-AAV) (véase, el documento US 2012/0141422). Los vectores auto-complementarios empaquetan un genoma de repetición invertido que puede incorporar ADNbc sin la necesidad de síntesis de ADN o apareamiento de bases entre múltiples genomas de vector. Debido a que el acAAV no tiene necesidad de convertir el genoma de ADN monocatenario (ADNmc) en ADN bicatenario (ADNbc) antes de la expresión, son vectores más eficientes. Sin embargo, la compensación para esta eficiencia es la pérdida de la mitad de la capacidad de codificación del vector, los acAAV son útiles para genes que codifican proteína pequeña (hasta ~55 kd) y cualquier terapia con base de ARN disponible actualmente.

Los vectores descritos en la presente memoria contienen secuencias de ácido nucleico que codifican una cápside de AAV intacta como se describe en la presente memoria. En una realización, la cápside comprende aminoácidos 1 a 738 de SEQ ID NO: 3 o 4. En otro aspecto, el AAV tiene una cápside de AAV recombinante que comprende una mutación en los aa 587-595 de la secuencia de proteína de la cápside de AAV8 en comparación con la secuencia de la cápside tipo salvaje de AAV8 o una mutación en una región correspondiente de otra proteína de la cápside de AAV en comparación con la correspondiente secuencia de la cápside tipo salvaje. En otro aspecto, la cápside de AAV comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2. En una realización, la cápside se codifica por la secuencia de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. En otro aspecto, el rAAV puede tener una proteína de la cápside que comprende una o más de las regiones de la cápside seleccionadas de vp2 y/o vp3, o de vp1, como se describe anteriormente.

Los vectores pseudotipados, en los que la cápside de un AAV se sustituye con una proteína de la cápside heteróloga, son útiles en la presente memoria. Por propósitos ilustrativos, se usa AAV2/8-b (o AAV2/8-h) en los ejemplos descritos a continuación. Véase, Mussolino et al, citado anteriormente. A menos que se especifique otra cosa, las ITR de AAV, y otros componentes de AAV seleccionados descritos en la presente memoria, pueden

seleccionarse individualmente de entre cualquier serotipo de AAV, incluyendo, sin limitación, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 u otros serotipos de AAV conocidos y desconocidos. En una realización deseable, se usan las ITR del serotipo 2 de AAV. Sin embargo, las ITR pueden seleccionarse de otros serotipos adecuados. Estas ITR u otros componentes de AAV pueden aislarse fácilmente usando técnicas disponibles para los expertos en la técnica desde un serotipo de AAV. Dicho AAV puede aislarse u obtenerse a partir de fuentes académicas, comerciales o públicas (p.ej., la Colección americana de cultivos tipo, Manassas, VA). De forma alternativa, las secuencias de AAV pueden obtenerse a través de medios sintéticos u otros medios adecuados por referencia a secuencias publicadas tal como están disponibles en la bibliografía o en bases de datos tales como, p.ej., GenBank, PubMed, o similares. En una realización, el AAV comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5, que corresponde a la secuencia de ADN de longitud total de AAV8-b. En otra realización, el AAV comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6, que corresponde a la secuencia de ADN de longitud total de AAV8-h.

El rAAV descrito en la presente memoria también comprende un mini-gen. El mini-gen está compuesto de, como mínimo, una secuencia de ácido nucleico heterólogo (el transgén), como se describe a continuación, y sus secuencias reguladoras, y las repeticiones terminales invertidas (ITR) 5' y 3' de AAV. Es este mini-gen el que se empaqueta en una proteína de la cápside y se distribuye a una célula diana seleccionada.

El transgén es una secuencia de ácido nucleico, heteróloga a las secuencias del vector que flanquean al transgén, que codifica un polipéptido, proteína u otro producto, de interés. La secuencia que codifica el ácido nucleico se une de forma operativa a los componentes reguladores de manera que permite la transcripción, traducción y/o expresión del transgén en una célula diana. La secuencia de ácido nucleico heterólogo (transgén) puede derivarse de cualquier organismo. El AAV puede comprender uno o más transgenes.

La composición de la secuencia del transgén dependerá del uso que se dé al vector resultante. En una realización deseable, el transgén se selecciona para proporcionar terapia optogenética. En la terapia optogenética, los fotorreceptores artificiales están contruidos mediante inserción génica de canales o bombas activadas por la luz a los tipos de células supervivientes en el circuito retiniano que queda. Esto es particularmente útil para pacientes que han perdido una cantidad significativa de la función fotorreceptora, pero cuyo circuito de células bipolares a células ganglionares y nervio óptico permanece intacto. En una realización, la secuencia de ácido nucleico heterólogo (transgén) es una opsina. La secuencia de opsina puede derivarse de cualquier organismo unicelular o multicelular adecuado, incluyendo humanos, algas y bacterias. En una realización, la opsina es rodopsina, fotopsina, opsina de longitud de onda L/M (rojo/verde), u opsina de longitud de onda corta (S) (azul). En otra realización, la opsina es canalrodopsina o halorodopsina.

En otro aspecto, el transgén se selecciona para usar en la terapia de aumento génico, es decir, proporcionar una copia de sustitución de un gen que está perdido o es defectuoso. En este aspecto, el transgén puede seleccionarse fácilmente por un experto en la técnica para proporcionar el gen de sustitución necesario. En una realización, el gen perdido/defectuoso está relacionado con un trastorno ocular. En una realización, el transgén es NYX, GRM6, TRPM1L o GPR179 y el trastorno ocular es ceguera nocturna estacionaria congénita. Véase, p.ej., Zeitz et al., Am J Hum Genet. 10 de enero de 2013; 92(1):67-75. Epub el 13 de diciembre de 2012.

En otro aspecto el transgén se selecciona para usar en la terapia de supresión génica, es decir, la expresión de uno o más genes nativos se interrumpe o suprime a niveles transcripcionales o traduccionales. Esto puede conseguirse usando el ARN corto en horquilla corta (ARNch) u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Véase, p.ej., Sun et al, Int J Cancer. 1 de febrero de 2010; 126(3):764-74 y O'Reilly M, et al., Am J Hum Genet. Julio de 2007; 81(1):127-35. En este aspecto el transgén puede seleccionarse fácilmente por un experto en la técnica en base al gen que se desea silenciar.

En otro aspecto, el transgén comprende más de un transgén. Esto puede conseguirse usando un único vector que porta dos o más secuencias heterólogas, o usando dos o más AAV que porta cada uno una o más secuencias heterólogas. En un aspecto, el AAV se usa para la co-terapia de supresión (o desactivación) génica y de aumento génico. En la co-terapia de desactivación/aumento, la copia defectuosa del gen de interés se silencia y se suministra una copia no mutada. En un aspecto, esto se consigue usando dos o más vectores co-administrados. Véase, Millington-Ward et al., Molecular Therapy, abril 2011, 19(4):642-649. Los transgenes pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la técnica en base al resultado deseado.

En otro aspecto, el transgén se selecciona para usar en la terapia de corrección génica. Esto puede conseguirse usando, p.ej., la rotura de ADN bicatenario inducida por la nucleasa con dedo de zinc (ZFN) en conjunto con un sustrato donante de ADN exógeno. Véase, p.ej., Ellis et al, Gene Therapy (epub enero de 2012) 20:35-42. Los transgenes pueden seleccionarse fácilmente por un experto en la técnica en base al resultado deseado.

En otra realización, el transgén se selecciona para usar en terapia génica con factor neurotrófico, es decir, proporcionando factores neurotróficos exógenos para proporcionar neuroprotección. En esta realización, el transgén puede ser cualquier factor neurotrófico, incluyendo el factor neurotrófico derivado ciliar (CNTF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor de viabilidad del cono derivado del bastón (RdCVF) (Yang et al, Mol Ther. Mayo de 2009; 17(5):787-95) y factor neurotrófico derivado del cerebro

(BDNF). Véase, p.ej., Schlichtenbrede et al, Gene Therapy (2003) 10, 523-527. El factor neurotrófico puede seleccionarse fácilmente por un experto en la técnica.

En otro aspecto, los transgenes útiles en la presente memoria incluyen secuencias indicadoras, que tras la expresión producen una señal detectable. Dichas secuencias indicadoras incluyen, sin limitación, secuencias de ADN que codifican la β -lactamasa, β -galactosidasa (LacZ), fosfatasa alcalina, timidina quinasa, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja (RFP), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciferasa, proteínas de unión a la membrana que incluyen, por ejemplo, CD2, CD4, CD8, la proteína hemaglutinina de la gripe, y otras bien conocidas en la técnica, en que anticuerpos de alta afinidad dirigidas a ellas existen o pueden producirse por medios convencionales, y proteínas de fusión que comprenden una proteína unida a la membrana pueden condensarse de forma apropiada a un dominio de etiqueta de antígeno de, entre otros, hemaglutinina o Myc.

Estas secuencias de codificación, cuando están asociadas con elementos reguladores que conducen su expresión, proporcionan señales detectables por medios convencionales, incluyendo ensayos enzimáticos, radiográficos, colorimétricos, de fluorescencia u otros ensayos espectrográficos, ensayos de clasificación de células de activación fluorescente y ensayos inmunológicos, que incluyen el ensayo de inmunoabsorción unido a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) e inmunohistoquímica. Por ejemplo, cuando la secuencia marcadora es el gen LacZ, la presencia del vector que porta la señal se detecta mediante ensayos para la actividad de beta-galactosidasa. Cuando el transgén es proteína fluorescente verde o luciferasa, el vector que porta la señal puede medirse visualmente mediante el color o la producción de luz en un luminómetro.

De forma deseable, el transgén codifica un producto que es útil en biología y medicina, tal como proteínas, péptidos, ARN, enzimas o ARN catalíticos. Las moléculas de ARN deseables incluyen ARNch, ARNt, ARNbc, ARN ribosómico, ARN catalíticos y ARN antisentido. Un ejemplo de una secuencia de ARN útil es una secuencia que extingue la expresión de una secuencia de ácido nucleico dirigido en el animal tratado.

El transgén puede usarse para corregir o mejorar deficiencias génicas (como en las solicitudes tratadas anteriormente), que pueden incluir deficiencias en que los genes normales se expresan a niveles menores que los normales o deficiencias en que el producto génico funcional no se expresa. Un tipo preferido de secuencia transgénica codifica una proteína o polipéptido terapéutico que se expresa en una célula diana. También se describe el uso de múltiples transgenes, p.ej., para corregir o mejorar un defecto génico provocado por una proteína de subunidad múltiple. En ciertas situaciones, un transgén diferente puede usarse para codificar cada subunidad de una proteína, o para codificar diferentes péptidos o proteínas. Esto es deseable cuando el tamaño del ADN que codifica la subunidad de proteína es grande. Para que la célula produzca la proteína de subunidad múltiple, una célula se infecta con el virus recombinante que contiene cada una de las diferentes subunidades. De forma alternativa, diferentes subunidades de una proteína pueden codificarse por el mismo transgén. En este caso, un único transgén incluye el ADN que codifica cada uno de las subunidades, con el ADN para cada subunidad separado por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Esto es deseable cuando el tamaño del ADN que codifica cada una de las subunidades es pequeña, p.ej., el tamaño total del ADN que codifica las subunidades y el IRES es menos de cinco kilobases. Como alternativa a un IRES, el ADN puede separarse por secuencias que codifican un péptido 2A, que se auto-escinde en un suceso post-traduccion. Véase, p.ej., M.L. Donnelly, et al, J. Gen. Virol., 78(Pt 1):13-21 (enero de 1997); Furler, S., et al., Gene Ther., 8(11):864-873 (junio 2001); Klump H., et al., Gene Ther., 8(10):811-817 (mayo de 2001). Este péptido 2A es significativamente más pequeño que un IRES, haciéndolo muy adecuado para usar cuando el espacio es un factor limitante. Sin embargo, el transgén seleccionado puede codificar cualquier producto biológicamente activo u otro producto, p.ej., un producto deseable para el estudio.

Las secuencias reguladoras incluyen elementos de control convencionales que se unen de forma operable al transgén en una manera que permite su transcripción, traducción y/o expresión en una célula transfectada con el vector o infectada con el virus producido como se describe en la presente memoria. Como se usa en la presente memoria, las secuencias "unidas de forma operable" incluyen ambas secuencias de control de expresión que están contiguas al gen de interés y las secuencias de control de expresión que actúan en *trans* o a una distancia para controlar el gen de interés.

Las secuencias de control de expresión incluyen las secuencias apropiadas de inicio de transcripción, terminación, promotora y potenciadora; señales de procesamiento de ARN eficientes tales como señales de corte y empalme poliadenilación (poliA); secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de traducción (es decir, secuencia de consenso Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y cuando se desea, secuencias que mejoran la secreción del producto codificado. Un gran número de secuencias de control de expresión, que incluyen promotores, se conocen en la técnica y pueden utilizarse.

Las secuencias reguladoras útiles en los constructos proporcionados en la presente memoria pueden contener también un intrón, deseablemente situado entre la secuencia promotora/potenciadora y el gen. Una secuencia de intrón deseable se deriva de SV-40, y es un mini-intrón de 100 pb dador de corte y empalme/aceptor de corte y empalme denominado como SD-SA. Otra secuencia adecuada incluye el elemento post-transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota. (Véase, p.ej., L. Wang e I. Verma, 1999 Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 96:3906-3910). Las señales poliA pueden derivarse de muchas especies adecuadas, que incluyen, sin limitación SV-40, humano y bovino.

Otro componente regulador del rAAV útil en los métodos descritos en la presente memoria es un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Una secuencia IRES, u otros sistemas adecuados, pueden usarse para producir más de un polipéptido a partir de un transcrito de gen único. Un IRES (u otra secuencia adecuada) se usa para producir una proteína que contiene más de una cadena de polipéptido o para expresar dos diferentes proteínas de o en la misma célula. Un IRES ejemplar es la secuencia de entrada interna al ribosoma del poliovirus, que soporta la expresión transgénica en los fotorreceptores, células RPE y ganglionares. Preferiblemente, el IRES se sitúa 3' al transgén en el vector rAAV.

En una realización, el AAV comprende un promotor (o un fragmento funcional de un promotor). La selección del promotor a emplear en el rAAV puede hacerse de entre un amplio número de promotores constitutivos o inducibles que pueden expresar el transgén seleccionado en la célula diana deseada. En una realización, la célula diana es una célula ocular. El promotor puede derivarse de cualquier especie, incluyendo humana. Deseablemente, en una realización, el promotor es "específico de la célula". El término "específico de la célula" significa que el promotor particular seleccionado para el vector recombinante puede dirigir la expresión del transgén seleccionado en una célula particular o tipo de célula ocular. En una realización, el promotor es específico para la expresión del transgén en las células fotorreceptoras. En otro aspecto, el promotor es específico para la expresión en los bastones y/o conos. En otro aspecto, el promotor es específico para la expresión del transgén en células RPE. En otra realización, el promotor es específico para la expresión del transgén en las células ganglionares. En otro aspecto, el promotor es específico para la expresión del transgén en células de Mueller. En otra realización, el promotor es específico para la expresión del transgén en células bipolares. En otra realización, el promotor es específico para la expresión del transgén en células bipolar ON. En una realización, el promotor es promotor del receptor de glutamato metabotrópico 6 (mGluR6) (véase, Vardi et al, mGluR6 Transcripts in Non-neuronal Tissues, J Histochem Cytochem. Diciembre de 2011, 59(12):1076-1086). En otra realización, el promotor es un promotor mGluR6 unido a un potenciador. En otra realización, el promotor es específico para la expresión del transgén en células bipolares OFF. En otra realización, el promotor es específico para la expresión del transgén en células horizontales. En otro aspecto, el promotor es específico para la expresión del transgén en células amacrinas. En otro aspecto, el transgén se expresa en cualquiera de las células oculares anotadas anteriormente.

En otra realización, el promotor es el promotor nativo para que se exprese el gen. Los promotores útiles incluyen, sin limitación, el promotor de opsina de bastones, el promotor de opsina rojo-verde, el promotor de opsina azul, el promotor de cGMP- β -fosfodiesterasa, el promotor de opsina de ratón (Beltran et al 2010 citado anteriormente), el promotor de rodopsina (Mussolino et al, Gene Ther, julio de 2011, 18(7):637-45); la alfa-subunidad de transducina del cono (Morrissey et al, BMC Dev, Biol, enero de 2011, 11:3); promotor de beta-fosfodiesterasa (PDE); el promotor de la retinitis pigmentosa (RP1) (Nicord et al, J. Gene Med, diciembre de 2007, 9(12):1015-23); el promotor NXNL2/NXNL1 (Lambard et al, PLoS One, octubre de 2010, 5(10):e13025), el promotor de RPE65; el promotor de degeneración retiniana lenta/periferina 2 (*Rds/perph2*) (Cai et al, Exp Eye Res. agosto de 2010; 91(2):186-94); y el promotor de VMD2 (Kachi et al, Human Gene Therapy, 2009 (20:31-9)).

Otros promotores útiles incluyen promotores del factor de transcripción que incluyen, sin limitación, promotores para la cremallera de leucina de la retina neuronal (Nrl), receptor nuclear específico para el fotorreceptor Nr2e3, y cremallera de leucina básica (bZIP). En un aspecto, el promotor es de un pequeño tamaño, por debajo de 1000 pb, debido a las limitaciones de tamaño del vector de AAV. En otro aspecto, el promotor está por debajo de 400 pb.

Otros promotores útiles en la presente memoria incluyen promotores ubicuos o constitutivos, cuando se desea la expresión universal del transgén. En una realización, el promotor se selecciona del promotor de EF1 α humano, promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), y promotor de citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el potenciador de CMV). Otros ejemplos de promotores constitutivos útiles en la presente memoria incluyen, sin limitación, el promotor de LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) retroviral (opcionalmente con el potenciador de RSV), el promotor de SV40, el promotor de dihidrofolato reductasa, el promotor de β -actina de pollo (CBA), y el potenciador de CMV temprano inmediato acoplado con el promotor de CBA.

Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión génica y puede regularse mediante compuestos suministrados de forma exógena, factores medioambientales tales como la temperatura, o la presencia de un estado fisiológico específico, p.ej., fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula, o solo en células replicantes. En un aspecto, el promotor inducible se selecciona del promotor de rapamicina/rapalog, el promotor de ecdisona, el promotor sensible al estrógeno, y el promotor sensible a la tetraciclina. Ejemplos de otros promotores inducibles regulados por compuestos suministrados de forma exógena que son útiles en la presente memoria, incluyen, el promotor de metalotionina (MT) de oveja inducible por zinc, promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema promotor de polimerasa T7. Otros tipos de promotores inducibles que pueden ser útiles en este contexto son aquellos que están regulados por un estado fisiológico específico, p.ej., temperatura, fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula, o solo en células replicantes. En un aspecto, puede usarse cualquier tipo de promotor inducible que esté firmemente regulado y sea específico para el tipo de célula ocular diana particular.

Otras secuencias reguladoras útiles en la presente memoria incluyen secuencias potenciadoras. Las secuencias potenciadoras útiles en la presente memoria incluyen el potenciador IRBP (Nicord 2007, citado anteriormente),

potenciador del citomegalovirus temprano inmediato, uno derivado de un gen de inmunoglobulina o potenciador de SV40, el elemento que actúa en cis identificado en el promotor proximal de ratón, etc.

La selección de estos y otros vectores comunes y elementos reguladores son convencionales y muchas de dichas secuencias están disponibles. Véase, p.ej., Sambrook et al, y referencias citadas en él en, por ejemplo, las páginas 3.18-3.26 y 16.17-16.27 y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, 1989). Por supuesto, no todos los vectores y las secuencias de control de expresión funcionarán igualmente bien para expresar todos los transgenes como se describe en la presente memoria. Sin embargo, un experto en la técnica puede hacer una selección entre estas, y otras, secuencias de control de expresión.

En otro aspecto, se describe un método para generar un virus adeno-asociado recombinante. Se genera un virus adeno-asociado (AAV) recombinante adecuado cultivando una célula huésped que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside de AAV como se describe en la presente memoria, o un fragmento de la misma; un gen *rep* funcional; un mini-gen compuesto de, como mínimo, repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV y una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un transgén deseable; y funciones de ayuda suficientes para permitir el empaquetado del mini-gen en la proteína de la cápside de AAV. Los componentes necesarios a cultivar en la célula huésped para empaquetar un mini-gen de AAV en una cápside de AAV pueden proporcionarse a la célula huésped en *trans*. De forma alternativa, cualquiera de uno o más de los componentes necesarios (p.ej., mini-gen, secuencias *rep*, secuencias *cap*, y/o funciones de ayuda) pueden proporcionarse mediante una célula huésped estable que se ha diseñado para contener uno o más de los componentes necesarios usando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Lo más adecuado, dicha célula huésped estable contendrá el (los) componente(s) necesario(s) bajo el control de un promotor inducible. Sin embargo, el (los) componente(s) necesario(s) puede(n) estar bajo el control de un promotor constitutivo. Ejemplos de promotores inducibles y constitutivos adecuados se proporcionan en la presente memoria, en la discusión posterior de elementos reguladores adecuados para usar con el transgén. En aún otra alternativa, una célula huésped estable seleccionada puede contener componente(s) seleccionado(s) bajo el control de un promotor constitutivo y otro(s) componente(s) seleccionado(s) bajo el control de uno o más promotores inducibles. Por ejemplo, puede generarse una célula huésped estable que se deriva de células 293 (que contienen funciones de ayuda E1 bajo el control de un promotor constitutivo), pero que contiene las proteínas *rep* y/o *cap* bajo el control de promotores inducibles. Aún otras células huésped estables pueden generarse por un experto en la técnica.

El mini-gen, secuencias *rep*, secuencias *cap*, y funciones de ayuda necesarios para producir el rAAV descrito en la presente memoria pueden distribuirse a la célula huésped de empaquetado en la forma de cualquier elemento genético que transfiera las secuencias portadas en él. El elemento genético seleccionado puede distribuirse por cualquier método adecuado, incluyendo los descritos en la presente memoria. Los métodos usados para construir cualquier realización se conocen por aquellos con habilidades en la manipulación de ácido nucleico e incluyen ingeniería genética, ingeniería recombinante y técnicas sintéticas. Véase, p.ej., Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. De forma similar, los métodos de generación de viriones de rAAV se conocen bien y la selección de un método adecuado. Véase, p.ej., K. Fisher et al, 1993 *J. Virol.*, 70:520-532 y la Patente de EE.UU. 5.478.745, entre otros.

C. Composiciones farmacéuticas y administración

El AAV recombinante que contiene el transgén y promotor específico de la célula deseados para usar en las células oculares diana como se detalla anteriormente se evalúa opcionalmente para la contaminación mediante métodos convencionales y se formula después en una composición farmacéutica prevista para inyección sub-retiniana o intravítrea. Dicha formulación implica el uso de un vehículo o portador farmacéuticamente y/o fisiológicamente aceptable, particularmente uno adecuado para la administración al ojo, p.ej., por inyección sub-retiniana, tal como solución salina tamponada u otros tampones, p.ej., HEPES, para mantener el pH a niveles fisiológicos apropiados, y, opcionalmente, otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, agentes estabilizantes, tampones, vehículos, adyuvantes, diluyentes, etc. Para la inyección, el vehículo será típicamente un líquido. Los vehículos fisiológicamente aceptables ejemplares incluyen agua estéril, libre de pirógenos, y solución salina tamponada con fosfato, estéril, libre de pirógenos. Una variedad de dichos vehículos conocidos se proporcionan en la Publicación de Patente de EE.UU. núm. 7.629.322. En un aspecto, el vehículo es una disolución de cloruro sódico isotónica. En otro aspecto, el vehículo es una solución salina equilibrada. En un aspecto, el vehículo incluye tween. Si el virus se va a almacenar a largo plazo, puede congelarse en presencia de glicerol o Tween20. En otro aspecto, el vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un tensioactivo, tal como perfluorooctano (Perfluoron líquido).

En ciertos aspectos de los métodos descritos en la presente memoria, la composición farmacéutica descrita anteriormente se administra al sujeto por inyección sub-retiniana. En otros aspectos, la composición farmacéutica se administra mediante inyección intravítrea. Otras formas de administración que pueden ser útiles en los métodos descritos en la presente memoria incluyen, aunque no están limitados a, distribución directa al órgano deseado (p.ej., al ojo), ruta oral, por inhalación, intranasal, intratraqueal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica y otras rutas parenterales de administración. Las rutas de administración pueden combinarse, si se desea.

Además, puede ser deseable realizar una captación de imágenes de la retina no invasiva y estudios funcionales para identificar áreas de células oculares específicas a las que dirigirse para la terapia. En estos aspectos, se emplean pruebas diagnósticas clínicas para determinar la(s) posición(ones) precisa(s) para una o más inyección(ones) sub-retiniana(s). Estas pruebas pueden incluir oftalmoscopia, electrorretinografía (ERG) (particularmente la medida de ondas b), perimetría, mapeo topográfico de las capas de la retina y medida del espesor de sus capas por medio de la oftalmoscopia láser de barrido confocal (cSLO) y tomografía de coherencia óptica (OCT), mapeo topográfico de la densidad de los conos por medio de ópticas adaptativas (AO), examen funcional del ojo, etc. Estas, y otras pruebas deseables, se describen en la Solicitud de Patente Internacional núm. PCT/US2013/022628. En vista de la captación de imágenes y estudios funcionales, se realizan una o más inyecciones en el mismo ojo para dirigirse a diferentes áreas de células bipolares conservadas. El volumen y títulos víricos de cada inyección se determinan de forma individual, como se describe adicionalmente a continuación, y pueden ser iguales o diferentes de otras inyecciones realizadas en el mismo ojo u ojo contralateral. En otro aspecto, se hace una única inyección de mayor volumen para tratar el ojo entero. En un aspecto, el volumen y concentración de la composición de rAAV se selecciona de manera que solo se impacte en una región específica de células oculares. En otro aspecto, el volumen y/o concentración de la composición de rAAV es una mayor cantidad, para alcanzar mayores porciones del ojo, incluyendo células oculares no dañadas.

La composición puede distribuirse en un volumen de aproximadamente 0,1 μ L a aproximadamente 1 mL, incluyendo todos los números dentro del intervalo, dependiendo del tamaño del área a tratar, los títulos víricos usados, la ruta de administración y el efecto deseado del método. El volumen puede ser aproximadamente 50 μ L, 70 μ L, 100 μ L, 125 μ L, 150 μ L, 175 μ L, 200 μ L, 250 μ L, 300 μ L, 450 μ L, 500 μ L, 600 μ L, 750 μ L, 850 μ L o 1000 μ L.

Una concentración efectiva de un virus adeno-asociado recombinante que porta una secuencia de ácido nucleico que codifica el transgén deseado bajo el control de la secuencia promotora específica para la célula oscila de forma deseable entre aproximadamente 10^7 y 10^{13} genomas de vector por milímetro (vg/mL) (también denominado copias de genoma/mL (GC/mL)). Las unidades infecciosas de rAAV se miden como se describe en S.K. McLaughlin et al, 1988 J. Virol., 62:1963. Preferiblemente, la concentración en la retina es de aproximadamente $1,5 \times 10^9$ vg/mL a aproximadamente $1,5 \times 10^{12}$ vg/mL, y más preferiblemente de aproximadamente $1,5 \times 10^9$ vg/mL a aproximadamente $1,5 \times 10^{11}$ vg/mL. En un aspecto, la concentración efectiva es aproximadamente $1,4 \times 10^8$ vg/mL. En un aspecto, la concentración efectiva es aproximadamente $3,5 \times 10^{10}$ vg/mL. En otro aspecto, la concentración efectiva es aproximadamente $5,6 \times 10^{11}$ vg/mL. En otra realización, la concentración efectiva es aproximadamente $5,3 \times 10^{12}$ vg/mL. En aún otro aspecto, la concentración efectiva es aproximadamente $1,5 \times 10^{12}$ vg/mL. En otro aspecto, la concentración efectiva es aproximadamente $1,5 \times 10^{13}$ genomas de vector. Es deseable que la concentración efectiva más baja del virus se utilice para reducir el riesgo de efectos indeseables, tales como toxicidad, displasia y desprendimiento de retina. Aún otras dosificaciones y volúmenes de administración en estos intervalos pueden seleccionarse por el médico que atiende, teniendo en cuenta el estado físico del sujeto, preferiblemente humano, que se trata, la edad del sujeto, el trastorno ocular particular y el grado al que el trastorno, si es progresivo, se ha desarrollado. Para la distribución extra-ocular, la dosificación se aumentará según el aumento desde la retina. La distribución intravenosa, por ejemplo puede necesitar dosis del orden de $1,5 \times 10^{13}$ vg/kg.

D. Métodos de tratamiento/profilaxis

Se describen en la presente memoria varios métodos de prevención, tratamiento, detención de la progresión de o mejora de los trastornos oculares descritos anteriormente y cambios en la retina asociados con ellos. Generalmente, los métodos incluyen administrar a un mamífero que lo necesita, una cantidad efectiva de una composición que comprende un virus adeno-asociado recombinante (AAV) descrito anteriormente, que porta una secuencia de ácido nucleico que codifica un transgén, o fragmento del mismo, bajo el control de secuencias reguladoras que expresan el producto del gen en las células oculares del sujeto, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Cualquiera de los AAV descritos en la presente memoria es útil en los métodos descritos a continuación.

Las enfermedades de la retina descritas anteriormente se asocian con varios cambios en la retina. Estos pueden incluir una pérdida de estructura o función del fotorreceptor; adelgazamiento o engrosamiento de la capa nuclear externa (ONL); adelgazamiento o engrosamiento de la capa plexiforme externa (OPL); desorganización seguida por pérdida de segmentos externos del bastón y el cono; acortamiento de los segmentos internos del bastón y el cono; retracción de las dendritas de células bipolares; adelgazamiento o engrosamiento de las capas internas de la retina incluyendo la capa nuclear interna, capa plexiforme interna, capa de células ganglionares y capa de fibra nerviosa; localización incorrecta de la opsina; sobre-expresión de neurofilamentos, adelgazamiento de partes específicas de la retina (tal como la fovea o mácula); pérdida de función de ERG; pérdida de agudeza visual y sensibilidad al contraste; pérdida de reflejos optocinéticos; pérdida del reflejo luminoso pupilar; y pérdida del comportamiento guiado visualmente. Se describe un método para prevenir, detener la progresión de o mejorar cualquiera de los cambios de la retina asociados con estas enfermedades de la retina. Como un resultado, se mejora la visión del sujeto, o se detiene y/o mejora la pérdida de visión.

En un aspecto particular, se describe un método para prevenir, detener la progresión de o mejorar la pérdida de visión asociada con un trastorno ocular en el sujeto.

La pérdida de visión asociada con un trastorno ocular se refiere a cualquier disminución en la visión periférica, visión central (lectura), visión nocturna, visión por el día, pérdida de la percepción del color, pérdida de la sensibilidad al contraste o reducción en la agudeza visual.

5 En otro aspecto, se describe un método para dirigirse a una o más células oculares por terapia optogenética en un sujeto que lo necesita. Como se trata anteriormente, la terapia optogenética es un método para proporcionar una función fotorreceptora "sustituta" en sujetos que tienen un daño del fotorreceptor significativo. En una realización, las células a las que se dirige la terapia optogenética son células bipolares. En otra realización, las células a las que se dirige la terapia optogenética son células ganglionares. En otra realización, todas las células son una diana.

10 Además, se describe un método para dirigirse a uno o más tipo(s) de células oculares para la terapia de aumento génico en un sujeto que lo necesita. En otro aspecto, se describe un método para dirigirse a uno o más tipos de células oculares para la terapia de supresión génica en un sujeto que lo necesita. En aún otro aspecto, se describe un método para dirigirse a uno o más tipos de células oculares para la terapia de desactivación/aumento génico en un sujeto que lo necesita. En otro aspecto, se describe un método para dirigirse a uno o más tipos de células oculares para la terapia de corrección génica en un sujeto que lo necesita. En aún otro aspecto, se describe un método para dirigirse a uno o más tipos de células oculares para la terapia génica con factor neurotrófico en un sujeto que lo necesita.

20 En cualquiera de los métodos descritos en la presente memoria, la célula diana puede ser una célula ocular. En un aspecto, la célula diana es una célula RPE. En otra realización, la célula diana es un fotorreceptor. En otra realización, el fotorreceptor es una célula cono. En otro aspecto, la célula diana es una célula de Mueller. En otra realización, la célula diana es una célula bipolar. En aún otra realización, la célula diana es una célula horizontal. En otro aspecto, la célula diana es una célula amacrina. En aún otra realización, la célula diana es una célula ganglionar. En aún otro aspecto, el gen puede expresarse e insertarse a un orgánulo intracelular, tal como una mitocondria o un lisosoma.

25 Como se usa en la presente memoria "pérdida de función del fotorreceptor" significa una disminución en la función del fotorreceptor en comparación con un ojo normal, no enfermo o el mismo ojo en un punto temporal anterior. Como se usa en la presente memoria, "aumentar la función del fotorreceptor" significa mejorar la función de los fotorreceptores o aumentar el número o porcentaje de fotorreceptores funcionales en comparación con un ojo enfermo (que tiene la misma enfermedad ocular), el mismo ojo en un punto temporal anterior, o la parte no tratada del mismo ojo, o el ojo contralateral del mismo paciente. La función del fotorreceptor puede evaluarse usando los estudios funcionales descritos anteriormente y en los ejemplos posteriores, p.ej., ERG o perimetría, que son convencionales en la técnica.

35 Para cada uno de los métodos descritos, el tratamiento puede usarse para evitar la ocurrencia del daño de la retina o salvar a los ojos que tienen enfermedad suave o avanzada. Como se usa en la presente memoria, el término "salvar" significa evitar la progresión de la enfermedad a ceguera total, evitar la ampliación del daño a células oculares no dañadas, mejorar el daño en células oculares dañadas, o proporcionar una visión mejorada. En un aspecto, la composición se administra antes de que la enfermedad se vuelva sintomática o antes de la pérdida de fotorreceptores. Por sintomática se entiende el comienzo de cualquiera de los diversos cambios retinianos descritos anteriormente o pérdida de visión. En otro aspecto, la composición se administra después de que la enfermedad se vuelva sintomática. En aún otro aspecto, la composición se administra después del inicio de la pérdida de fotorreceptores. En otro aspecto, la composición se administra después de que comience la degeneración de la capa nuclear externa (ONL). En algunos aspectos, es deseable que la composición se administre mientras el circuito de células bipolares a células ganglionares y nervio óptico permanece intacto. En una realización, las células bipolares son la diana de la terapia optogenética. Asegurando que la composición se administra mientras el circuito a las células ganglionares y el nervio óptico permanece intacto, es posible proporcionar células fotorreceptoras "sustitutas", y aumentar la visión.

45 En otro aspecto, la composición se administra después del inicio de la pérdida de fotorreceptores. En aún otro aspecto la composición se administra cuando menos del 90% de los fotorreceptores están funcionando o permanecen, en comparación con un ojo no enfermo. En otro aspecto, la composición se administra cuando menos del 80% de los fotorreceptores están funcionando o permanecen. En otro aspecto, la composición se administra cuando menos del 70% de los fotorreceptores están funcionando o permanecen. En otro aspecto, la composición se administra cuando menos del 60% de los fotorreceptores están funcionando o permanecen. En otro aspecto, la composición se administra cuando menos del 50% de los fotorreceptores están funcionando o permanecen. En otro aspecto, la composición se administra cuando menos del 40% de los fotorreceptores están funcionando o permanecen. En otro aspecto, la composición se administra cuando menos del 30% de los fotorreceptores están funcionando o permanecen. En otro aspecto, la composición se administra cuando menos del 20% de los fotorreceptores están funcionando o permanecen. En otro aspecto, la composición se administra cuando menos del 10% de los fotorreceptores están funcionando o permanecen. En un aspecto, la composición se administra solo a una o más regiones del ojo. En otro aspecto, la composición se administra al ojo entero.

60 En otro aspecto, el método incluye realizar estudios funcionales y de captación de imágenes para determinar la eficacia del tratamiento. Estos estudios incluyen ERG y captación de imágenes de la retina in vivo, como se describe

en los ejemplos posteriores. Además pueden realizarse estudios del campo visual, perimetría y microperimetría, pupilometría, pruebas de movilidad, agudeza visual, sensibilidad al contraste, pruebas de visión del color.

En aún otro aspecto, cualquiera de los métodos descritos anteriormente se realiza en combinación con otra terapia, o terapia secundaria. La terapia puede ser cualquier terapia conocida actualmente, o desconocida hasta ahora, que ayude a prevenir, detener o mejorar cualquiera de los cambios de la retina descritos y/o pérdida de visión. En una realización, la terapia secundaria es terapia de célula encapsulada (tal como la que distribuye del factor neurotrófico ciliar (CNTF)). Véase, Sieving, P.A. et al, 2006. Proc Natl Acad Sci EE.UU., 103(10):3896-3901. En otra realización, la terapia secundaria es una terapia con factor neurotrófico (tal como factor derivado del epitelio pigmentario, PEDF; factor neurotrófico ciliar 3; factor de viabilidad del cono derivado del bastón (RdCVF) o factor neurotrófico derivado de la glía). En otra realización, la terapia secundaria es terapia anti-apoptosis (tal como la que distribuye inhibidor unido a X de la apoptosis, XIAP). En aún otra realización, la terapia secundaria es factor de viabilidad del cono derivado del bastón 2. La terapia secundaria puede administrarse antes, de forma simultánea con, o después de la administración del AAV descrito anteriormente.

En otro aspecto, se describe un método de distribución de un transgén a una célula, comprendiendo dicho método la etapa de poner en contacto la célula con un AAV descrito en la presente memoria, en el que dicho AAV comprende el mini-gen.

En otro aspecto, se describe un método de distribución de una proteína al cerebro, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula ganglionar con un AAV descrito en la presente memoria, en el que dicho AAV comprende el mini-gen. En un aspecto, el AAV es AAV-b. En una realización, el AAV es AAV-8b.

En otro aspecto, el uso de un AAV o una molécula como se describe en la presente memoria se proporciona en la preparación de un medicamento para la distribución de una molécula de ácido nucleico heterólogo que codifica el producto a una célula. En aún otro aspecto, se proporciona una composición que comprende un AAV como se describe en la presente memoria, para usar en el tratamiento de una condición ocular.

Como se demuestra en los ejemplos posteriores, se emplearon AAV-8b y AAV-8h ejemplares en experimentos *in vivo* para proporcionar evidencia de la utilidad y eficacia de los métodos y composiciones descritas en la presente memoria. Los ejemplos demostraron el direccionamiento a células oculares en ratones y perro.

Además, estos resultados muestran que la inyección sub-retiniana de AAV8-b en el ojo de un modelo de animal grande da por resultado la transducción eficiente y de comienzo temprano de los fotorreceptores cono, células retinianas internas y células ganglionares. Se anotó que AAV8-b se dirige a los fotorreceptores cono de forma extremadamente eficiente. Esto proporciona una herramienta útil para distribuir la terapia optogenética mediada por halorodopsina. Además, AAV8-b es útil también para tratar enfermedades que se originan en los fotorreceptores cono, tal como la acromatopsia.

De forma notable hay poca si es que hay alguna transducción de las células RPE con AAV8-b incluso si el vector se inyecta de forma sub-retiniana. Que sepan los inventores, no hay otro vector que tenga esta característica. Todos los demás serotipos de AAV y todos los diferentes lentivirus pseudotipados que se dirigen al ojo, se dirigen a las células RPE de forma eficiente. Hay una gran necesidad de vectores AAV que no se dirijan a las células RPE para tratar trastornos retinianos neurales (y no los del RPE). Además, una falta de transducción del RPE atenúa los efectos secundarios/toxicidad procedente del direccionamiento a estas células.

Además, AAV-b se dirige a las células retinianas internas de forma eficiente y puede usarse para distribuir la terapia optogenética, incluyendo la terapia mediada por proteínas de canalopsina modificadas. El comienzo temprano de la expresión mediada por este vector permite la rápida inversión de los déficits sensorineurales.

Además, AAV-b se dirige a las células ganglionares de forma extremadamente eficiente después de la inyección tanto sub-retiniana como intravítrea. Por consiguiente, este vector puede usarse a través de la inyección intravítrea (un procedimiento de consultorio) para distribuir de forma eficiente proteínas secretables que incluyen, aunque no están limitadas a, factores neurotróficos, factores antineovascuales, moléculas que sirven como receptores señuelo para bloquear la función de proteínas indeseadas. Además, AAV-b, debido a su capacidad para dirigirse a células ganglionares, es útil en el tratamiento de glaucoma (una enfermedad que provoca la pérdida de células ganglionares).

Además, debido a que AAV-b se dirige a las células ganglionares de forma eficiente, este vector puede usarse para distribuir proteína al cerebro. Este enfoque es útil en el desarrollo de tratamientos para enfermedades degenerativas que afectan al cerebro, incluyendo enfermedades de almacenamiento lisosómico y enfermedades metabólicas.

Estos datos permiten a un experto en la técnica anticipar fácilmente que estos métodos pueden usarse de forma similar en el tratamiento de enfermedad retiniana en otros sujetos, incluyendo humanos.

E. Ejemplos

Ejemplo 1: Generación de mutantes

Para encontrar AAV recombinante capaz de transducir células bipolares, el bucle HI de VP3 divergente del gen de la cápside de AAV8 se fijó como objetivo para la mutación (Fig. 2). Brevemente, una biblioteca de mutaciones a través de 9 aminoácidos (aa 587-595 de vp1 de AAV8), se construyó en la cápside de AAV y esta biblioteca se clonó en el plásmido pRFP-AAV8cap (Fig. 3). La biblioteca vírica de AAV se produjo entonces por transfección triple de células 293T usando métodos estándar. Véase, p.ej., Flannery y Visel, *Methods in Molecular Biology*, 935:351-69 (septiembre de 2012).

A. Producción de la región mutada mediante DNA2.0.

La región del gen rep/cap de AAV8 entre los sitios sbf1 y mlu1 se sintetizó mediante la compañía DNA2.0 (<https://www.dna20.com/>). Esta región incluye los aminoácidos 587-595 (contando desde el primer aminoácido de vp1 de AAV8) y las mutaciones se incorporaron a cada posición de estos 9 aminoácidos. Una estrategia NNK combinatoria se usó para generar la máxima diversidad mientras se eliminaban dos de los tres posibles codones de parada (Muranaka et al., *Nucleic Acids Res.* 5 de enero de 2006; 34).

B. Clonado de la biblioteca del plásmido de AAV:

El plásmido pRed-Caps-Relleno se linealizó con sbf1 y mlu1 (un sitio sbf1 más corriente arriba se mutó usando un kit de mutagénesis dirigido al sitio antes del clonado para dar el sitio sbf1 extra inactivo). Se clonó la región mutada sintetizada en la estructura digerida de sbf1/mlu1 usando ADN T4 ligasa (New England Biolabs). Esta se electroporó en bacterias electrocompetentes DH10b (Invitrogen). Fue crucial que ninguna estructura sin cortar procedente del plásmido TS escapara a través del clonado ya que contaminaría y saturaría la biblioteca. La ausencia de estructura se confirmó por la ausencia de crecimiento en placas de agar-kanamicina.

Hasta 20 ul del caldo de transformación se pusieron en placas de agar-Ampicilina para estimar el número de transformantes. El resto del caldo se usó para inocular 2 litros de caldo para preparar ADN de la biblioteca del plásmido rep/cap para la producción de AAV.

C. Producción de la biblioteca de AAV

El AAV se preparó según los protocolos de transfección triple estándar con algunas especificaciones:

Para evitar el empaquetado de múltiples genomas en cada cápside se usó una baja concentración de plásmido para la transfección triple – se usaron 150 ng de plásmido de biblioteca rep/cap por 150 mm de placa de cultivo celular HEK293 confluyente. Mediante el número de Avogadro y el peso molecular del plásmido se estimó que 200 moléculas de cápside de ADN estaban presentes por célula HEK293. En última instancia, los lisatos y caldos celulares transfectados a partir de 70 placas transfectadas de 150 mm confluentes se usaron para preparar la biblioteca. Este caldo y lisatos tratados con benzonasa se concentraron 20 veces usando un sistema de filtración de flujo tangencial antes de la producción del virus según el estado de la técnica.

Ejemplo 2: Selección del mutante

La librería vírica (2 µl) se inyectó de forma sub-retiniana en 10 ratones transgénicos adultos con células bipolares ON marcadas con GFP (ratones mGluR6-EGFP, como se describe en Dhingra et al, *J Comp Neurol.* 10 de octubre de 2008; 510(5):484-96). Después de 3 semanas, las células marcadas con GFP se aislaron después de la clasificación FACS de disociación de células de la retina. Los virus se aislaron de las células bipolares y la región mutante de la cápside se amplificó por PCR y se secuenció. Estas secuencias de la cápside fueron después reincorporadas en el plásmido cap pRFP-AAV8 para una segunda vuelta de producción de biblioteca e inyección.

Después de 3 semanas, se realizó de nuevo la clasificación FACS. Las células bipolares ON expresaron un doble positivo para dsRED y GFP. Las células no bipolares transfectadas con AAV fueron positivas para dsRED solo. Las células bipolares ON explicaron aproximadamente el 1% de la población parental, mientras que las no bipolares transfectadas explicaron aproximadamente el 9,1% (Fig. 4). Se notó que una gran variedad de mutantes se aislaron tanto de células positivas GFP (células bipolares) como células negativas GFP (células no bipolares) en la primera vuelta de la selección. Por consiguiente, en la segunda vuelta, se añadió a la biblioteca AAV8 TS para actuar como una fuerza selectiva competitiva negativa. A partir de esta vuelta solo se encontraron secuencias mutantes en las células positivas en GFP (células bipolares, células “doble positivas”) con secuencias solo TS aisladas desde las células negativas en GFP.

A partir de estas células “doble positivas”, los AAV se aislaron y se secuenciaron. Cinco (5) variantes se secuenciaron (Fig. 5). Los vectores AAV se crearon entonces usando cada una de estas secuencias mutantes en lugar del gen de la cápside de AAV8 tipo salvaje en un vector AAV(EF1α-EGFP). Este virus expresa EGFP bajo el control del promotor de EF1α humano (Nakai et al, *J. Virology*, 79(6):3606-14 (marzo de 2005)). Un mutante adicional, que porta un codón de parada prematuro, se usó también para crear un virus (Variante 5, Fig. 5). Estos virus se inyectaron de forma sub-retiniana (1,5 µl) en ratones C57B16 (TS) de 10 semanas de edad. Después de tres semanas los ratones se sacrificaron, la retina se quitó y se hicieron secciones con vibrátomo de 150 µm del tejido (véase, p.ej., http://www.immunostar.com/content/pdf/instruction_manual.pdf). Las Figs. 6A-E muestran la expresión de EGFP en la retina inyectada con variantes de AAV 1-5. La variante 1 muestra fluorescencia en una

variedad diversa de tipos de células con la fluorescencia más escasa entre las capas plexiformes externa (OPL) e interna (IPL) donde los subtipos de células bipolares se encuentran (Fig. 6A). Esta estratificación se identifica usando un marcador para la acetilcolina transferasa (anti-ChAT). El patrón de transducción para la variante 1 es cualitativamente similar al visto con la cápside de AAV8 tipo salvaje. En contraste se encuentra una fuerte tinción de fluorescencia para la variante 2 (AAV8b) en esta región plexiforme externa-interna (fig. 6B, mostrada por una flecha) con muchas células bipolares y amacrinas teñidas. La tinción de células bipolares se identifica aquí con el marcador anti-PKC α . Además, los cuerpos celulares de fotorreceptores en la capa nuclear externa y sus segmentos externos están fuertemente teñidos. El virus variante 3 muestra un patrón de tinción más distintivo con tinción densa a lo largo de la capa plexiforme externa con marcaje de los cuerpos de células horizontales y su red densa de dendritas en propagación (Fig. 6C, mostrado por una flecha). La falta de tinción en la capa nuclear externa sugiere que esta variante selecciona frente a la transducción de las células fotorreceptoras. La tinción de la variante 4 es escasa con solo unas pocas células horizontales y amacrinas marcadas (Fig. 6D).

La variante 2, preferentemente transdujo células bipolares y se denominó AAV8-b. La variante 3 preferentemente transdujo células horizontales y se denominó AAV8-h. En base a estos resultados, se seleccionaron las variantes 2 y 3 para el análisis adicional.

Ejemplo 3: Expresión de AAV8-b en comparación con AAV8ts usando el promotor ubicuo EF1 α

Se inyectaron de forma sub-retiniana 1,5 μ l de AAV8-b(EF1 α -EGFP) a un título de $5,3 \times 10^{12}$ gc/ml en ratones C57B16 (TS) de 10 semanas de edad (n=5). Para la comparación, se inyectaron de forma sub-retiniana 1,5 μ l de AAV8ts-(EF1 α -EGFP) a un título de $6,4 \times 10^{13}$ gc/ml en ratones C57B16 (TS) de 10 semanas de edad (n=5). Después de tres semanas los ratones se sacrificaron, las retinas se quitaron y se hicieron secciones con vibrátomo de 150 μ m del tejido. Se realizó inmunotinción para identificar estratos de células bipolares (anti-ChAT). Esto necesita una incubación de 7 días provocando una pérdida de fluorescencia, por lo tanto GFP se marcó también (anti-GFP). Las secciones se captaron por imágenes mediante microscopía confocal con intensidades de láser equivalentes, ganancias y tamaños de etapa para una pila-z 40X. Las células bipolares fluorescentes están marcadas con una flecha para distinguirlas de las células amacrinas (Fig. 7). Los cuerpos de células amacrinas están justo debajo de los cuerpos de células bipolares y tienen un árbol dendrítico que se expande de forma horizontal a través del plano de la retina directamente desde el cuerpo de la célula. El cuerpo de la célula bipolar tiene un axón "real" que desciende a través de la capa plexiforme interna a los botones terminales en la capa de células ganglionares (véase también la Figura 11: AAV-8b-mG6-EGFP).

La tinción por fluorescencia muestra una fuerte transducción de la membrana de Bruch y su membrana limitante interna de la retina de ratón por AAV8ts-EF1 α -EGFP. En contraste, estas membranas no son fluorescentes en retinas transducidas con AAV8b-EF1 α -EGFP. Esto puede explicar la mayor difusión del virus AAV8b a través de la retina con fluorescencia más fuerte en la región entre las capas plexiformes interna y externa para AAV8b en comparación con AAV8ts. Notar que estas retinas se marcaron además para acetilcolina transferasa para identificar la región entre las capas plexiformes interna y externa.

Ejemplo 4: Transducción de la retina de perro tipo salvaje con AAV8-b

Ambos ojos de un perro macho de vista normal, de aproximadamente 14 meses de edad, se inyectaron con AAV8-b. El ojo derecho recibió una inyección sub-retiniana de $1,66 \times 10^{10}$ copias de genoma (GC) en 0,2 ml. El ojo izquierdo recibió una inyección intravítrea de $1,66 \times 10^{10}$ en 0,2 ml. El perro se examinó mediante oftalmoscopia diaria después de la inyección para monitorizar la inflamación potencial y para determinar cuando la expresión transgénica se volvió primero evidente. A partir de ahí el animal se evaluó a intervalos semanales. Las fotografías del fondo se hicieron 22 días después de la inyección. Se hizo la eutanasia al animal 33 días después de la inyección. La apariencia oftalmoscópica no había cambiado de la anotada el día 22.

No se notó inflamación en ningún punto temporal después de la inyección. Se identificó primero EGFP por oftalmoscopia 5 días después de la inyección en el ojo inyectado de forma sub-retiniana. Los niveles de EGFP detectables por oftalmoscopia aumentaron a través a lo largo del punto temporal de dos semanas y se estabilizó (Figura 8). No fue detectable EGFP por oftalmoscopia en el ojo inyectado de forma intravítrea. Se anotó que el perro permaneció sano y activo a lo largo del estudio. En la necropsia, no se notaron anomalías en patología macroscópica.

Los análisis histológicos del ojo inyectado de forma sub-retiniana no revelaron evidencias de inflamación (infiltrado celular, células inmunes) (Figura 9) o degeneración retiniana (hubo un espesor normal de las capas de fotorreceptor en regiones inyectadas y no inyectadas de la retina) (Figura 9A). Las células positivas en GFP se notaron solo en la región de la inyección sub-retiniana (y en la región que apareció como GFP positiva por oftalmoscopia) (Figura 9A). Las células positivas en GFP se identificaron provisionalmente por su morfología y posición en la retina e incluyeron fotorreceptores como (Figuras 9A-9B), células nucleares internas, y células ganglionares. Las células nucleares internas (Fig. 9) y células ganglionares (Fig. 10) incluyeron células con altos niveles de EGFP y también células con menores niveles de GFP.

Los análisis histológicos del ojo inyectado de forma intravítrea no revelaron evidencia de inflamación (infiltrado celular, células inmunes) (Figura 10) o degeneración de la retina. EGFP fue detectable en las células ganglionares por microscopia de fluorescencia.

Ejemplo 5: Expresión de canalrodopsina usando un promotor específico para la célula bipolar.

- 5 Para examinar la expresión específica de la célula bipolar de una proteína ocular, los ratones TS se inyectaron de forma sub-retiniana con AAV8-b que portaba promotor específico de la célula bipolar ON que conducía canalrodopsina (ChR2)-EGFP. El promotor específico de la célula bipolar ON era el promotor del receptor de glutamato metabotrópico 6 (mGluR6). Las células bipolares OFF terminan en la sub-lámina 1 y 2 y tienen axones más cortos que las tipo ON que terminan en sub-lámina 4 y 5 (Fig. 11b). Por consiguiente, el subtipo de célula bipolar ON puede distinguirse de la célula bipolar OFF que usa la tinción ChAT que identifica la sub-lámina específica de la capa plexiforme interna.

Se observó la expresión en células bipolares bastón (ON) (Fig. 11a). Los terminales de célula bipolar ON son brillantes (Fig. 11a), en la posición óptima para los canales ChR2.

- 15 Aunque la invención precedente se ha descrito en algunos detalles por medio de la ilustración y ejemplo para el propósito de claridad de entendimiento, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que ciertos cambios y modificaciones pueden hacerse.

Referencias

1. Stieger, K., Cronin, T., Bennett, J. y Rolling, F. Adeno-associated virus mediated gene therapy for retinal degenerative diseases. *Methods Mol Biol* 807, 179-218 (2011).
- 20 2. Maguire, A.M., et al. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358, 2240-2248 (2008).
3. Bainbridge, J.W., et al. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358, 2231-2239 (2008).
- 25 4. Hauswirth, W.W., et al. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther* 19, 979-990 (2008).
5. Doroudchi, M.M., et al. Virally delivered Channelrhodopsin-2 Safely and Effectively Restores Visual Function in Multiple Mouse Models of Blindness. *Mol Ther* 19, 1220-1229 (2011).
6. Lagali, P.S., et al. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci* 11, 667-675 (2008).
- 30 7. Petrs-Silva, H., et al. Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. *Mol Ther* 19, 293-301 (2011).
8. Humayun, M., et al. Results Update from Second Sight's Argus II Retinal Prosthesis Study. en *ARVO* (Ft. Lauderdale, 2012).
- 35 9. Schwartz, S.D., et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 379, 713-720 (2012).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Los administradores de la universidad de Pensilvania
 Bennett, Jean
 5 Cronin, Therese
 Vanderberghe, Luk

<120> transferencia génica mediada por AAV mejorado para terapias de la retina

10 <130> UPN-Z6471PCT

<150> US 61/762.775
 <151> 08-02-2013

15 <160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 20 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> mutación AAV-b de aa 587-595 de AAV

<400> 1
 Pro Glu Arg Thr Ala Met Ser Leu Pro
 1 5

30 <210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> mutación AAV-h en aa 587-595 de AAV

<400> 2
 40 Ser Phe Ser Arg Ala Val Leu Cys Asp
 1 5

<210> 3
 <211> 738
 45 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cápside de AAV-8b de longitud total

50 <400> 3

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
 1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
 20 25 30

ES 2 741 502 T3

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115 120 125
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
 145 150 155 160
 Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
 165 170 175
 Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro
 180 185 190
 Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly
 195 200 205
 Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
 210 215 220
 Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
 225 230 235 240
 Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
 245 250 255
 Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ala Thr Asn Asp
 260 265 270
 Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
 275 280 285

ES 2 741 502 T3

Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
 290 295 300
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn
 305 310 315 320
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
 325 330 335
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
 340 345 350
 Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
 355 360 365
 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
 370 375 380
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
 385 390 395 400
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Thr Tyr
 405 410 415
 Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
 420 425 430
 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 435 440 445
 Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Asn Thr Gln Thr Leu Gly
 450 455 460
 Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly
 485 490 495
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Ala Gly Thr Lys Tyr His
 500 505 510
 Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala Met Ala Thr
 515 520 525
 His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Asn Gly Ile Leu Ile

ES 2 741 502 T3

530		535		540
Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val				
545		550		555
				560
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr				
		565		570
				575
Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Pro Glu Arg Thr Ala Met				
		580		585
				590
Ser Leu Pro Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val				
		595		600
				605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile				
		610		615
				620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe				
		625		630
				635
				640
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val				
		645		650
				655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe				
		660		665
				670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu				
		675		680
				685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr				
		690		695
				700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu				
		705		710
				715
				720
Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg				
		725		730
				735

Asn Leu

<210> 4

<211> 738

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cápside de AAV-8h de longitud total

<400> 4

ES 2 741 502 T3

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115 120 125
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
 145 150 155 160
 Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
 165 170 175
 Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro
 180 185 190
 Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly
 195 200 205
 Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
 210 215 220
 Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
 225 230 235 240
 Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His

ES 2 741 502 T3

245	250	255
Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ala Thr Asn Asp 260 265 270		
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn 275 280 285		
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn 290 295 300		
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn 305 310 315 320		
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala 325 330 335		
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln 340 345 350		
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe 355 360 365		
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn 370 375 380		
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr 385 390 395 400		
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Thr Tyr 405 410 415		
Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser 420 425 430		
Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu 435 440 445		
Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Asn Thr Gln Thr Leu Gly 450 455 460		
Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp 465 470 475 480		
Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly 485 490 495		

ES 2 741 502 T3

Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Ala Gly Thr Lys Tyr His
500 505 510

Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala Met Ala Thr
515 520 525

His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Asn Gly Ile Leu Ile
530 535 540

Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val
545 550 555 560

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
565 570 575

Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Ser Phe Ser Arg Ala Val
580 585 590

Leu Cys Asp Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
595 600 605

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
610 615 620

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
625 630 635 640

Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
645 650 655

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe
660 665 670

Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
675 680 685

Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
690 695 700

Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu
705 710 715 720

Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg
725 730 735

Asn Leu

<210> 5

<211> 2214

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> secuencia de codificación de la cápside de AAV-8b de longitud total

10

<400> 5

ES 2 741 502 T3

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc	60
gagtggggg cgctgaaacc tggagccccg aagcccaaag ccaaccagca aaagcaggac	120
gacggccggg gtctgggtgt tcttggttac aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac	180
aagggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac	240
cagcagctgc aggcgggtga caatccgtac ctgcggtata accacgccga cgcgagttt	300
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttcag	360
gccaagaagc gggttctcga acctctcggg ctggttgagg aaggcgctaa gacggctcct	420
ggaaagaaga gaccggtaga gccatcaccc cagcgttctc cagactcctc tacgggcac	480
ggcaagaagc gccaacagcc cgccagaaaa agactcaatt ttggtcagac tggcgactca	540
gagtcagttc cagacctca acctctcgga gaacctcag cagcgccctc tgggtgtggga	600
cctaatacaa tggctgcagg cgggtggcgca ccaatggcag acaataacga aggcgcccac	660
ggagtgggta gttcctcggg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc	720
atcaccacca gcaaccgaac ctggggccctg cccacctaca acaaccacct ctacaagcaa	780
atctccaacg ggacatcggg aggagccacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc	840
ccctgggggt attttgactt taacagattc cactgccact tttcaccacg tgactggcag	900
cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagagac tcagcttcaa gctcttcaac	960
atccagggtc aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccaaga ccatcgccaa taacctcacc	1020
agcaccatcc aggtgtttac ggactcggag taccagctgc cgtacgttct cggctctgcc	1080
caccagggtc gcctgcctcc gttcccgcg gacgtgttca tgattcccca gtacggctac	1140
ctaactca acaacggtag tcaggccgtg ggacgctcct ctttctactg cctggaatac	1200
tttctctgc agatgctgag aaccggcaac aacttccagt ttacttacac cttcgaggac	1260
gtgcctttcc acagcagcta cgcacacagc cagagcttgg accggctgat gaatcctctg	1320
attgaccagt acctgtacta cttgtctcgg actcaaaca caggaggcac ggcaaatagc	1380
cagactctgg gcttcagcca aggtgggcct aatacaatgg ccaatcaggc aaagaactgg	1440
ctgccaggac cctgttaccg ccaacaacgc gtctcaacga caaccgggca aaacaacaat	1500
agcaactttg cctggactgc tgggaccaa taccatctga atggaagaaa ttcattggct	1560
aatcctggca tcgctatggc aacacacaaa gacgacgagg agcgtttttt tcccagtaac	1620
gggatcctga tttttggcaa acaaatgct gccagagaca atgoggatta cagcgatgtc	1680
atgctcacca gcgaggaaga aatcaaaacc actaacctg tggctacaga ggaatacgg	1740
atcgtggcag ataacttgcc tgagcggacg gcgatgagtc ttccgggaac tgtcaacagc	1800
cagggggcct taccgggtat ggtctggcag aaccgggacg tgtacctgca gggccccac	1860
tgggccaaga ttcttcacac ggacggcaac ttccaccctg ctccgctgat gggcggttt	1920
ggcctgaaac atcctccgcc tcagatcctg atcaagaaca cgctgtacc tgcggtcct	1980
ccgaccacct tcaaccagtc aaagctgaac tctttcatca cgcaatacag caccggacag	2040
gtcagcgtgg aaattgaatg ggagctgcag aaggaaaaca gcaagcgtg gaaccccgag	2100
atccagtaca cctccaacta ctacaaatct acaagtgtgg actttgctgt taatacagaa	2160
ggcgtgtact ctgaaccccg cccattggc acccgttacc tcaccgtaa tctg	2214

<210> 6
 <211> 2214
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> secuencia de codificación de la cápside de AAV-8h de longitud total

10 <400> 6
 atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc 60
 gagtggtagg cgctgaaacc tggagcccg aagcccaaag ccaaccagca aaagcaggac 120
 gacggccggg gtctgggtct tctgggtac aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac 180
 aagggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240
 cagcagctgc agcggggtga caatccgtac ctgcggtata accacgccga cgccgagttt 300
 caggagcgctc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggagagc agtcttccag 360
 gccaaagaagc gggttctcga acctctcggg ctggttgagg aaggcgctaa gacggctcct 420
 ggaaagaaga gaccggtaga gccatcacc cagcgttctc cagactcctc tacgggcatc 480
 ggcaagaaag gccaacagcc cgccagaaa agactcaatt ttggtcagac tggcgactca 540
 gagtcaagtc cagaccctca acctctcggg gaacctccag cagcgccctc tgggtgtggg 600
 cctaatacaa tggctgcagg cggtaggcga ccaatggcag acaataacga aggcgccgac 660
 ggagtgggta gttcctcggg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc 720
 atcaccacca gcacccgaac ctgggcccctg cccacctaca acaaccacct ctacaagcaa 780
 atctccaacg ggacatcggg aggagccacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc 840
 ccctgggggt attttgactt taacagattc cactgccact tttcaccag tgactggcag 900
 cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagagac tcagcttcaa gctcttcaac 960

ES 2 741 502 T3

```

atccagggtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccaaga ccatcgccaa taacctcacc 1020
agcaccatcc aggtgtttac ggactcggag taccagctgc cgtacgttct cggctctgcc 1080
caccagggct gcctgcctcc gttcccgcg gacgtgttca tgattcccca gtacggctac 1140
ctaactctca acaacggtag tcaggccgtg ggacgctcct ctttctactg cctggaatac 1200
tttccttcgc agatgctgag aaccggcaac aacttccagt ttacttacac cttcgaggac 1260
gtgcctttcc acagcagcta cggccacagc cagagcttgg accggctgat gaatcctctg 1320
attgaccagt acctgtacta cttgtctcgg actcaaaca caggaggcac ggcaaatacg 1380
cagactctgg gcttcagcca aggtgggcct aatacaatgg ccaatcaggc aaagaactgg 1440
ctgccaggac cctgttacgg ccaacaacgc gtctcaacga caaccgggca aaacaacaat 1500
agcaactttg cctggactgc tgggaccaa taccatctga atggaagaaa ttcattggct 1560
aatcctggca tcgctatggc aacacacaaa gacgacgagg agcgtttttt tcccagtaac 1620
gggatcctga tttttggcaa acaaatgct gccagagaca atgaggatta cagcgatgtc 1680
atgctcacca gcgaggaaga aatcaaaacc actaaccctg tggtacaga ggaatacggc 1740
atcgtggcag ataacttgag ttttagtcgt gcggttcttt gtgatggaac tgtcaacagc 1800
cagggggcct taccgggtat ggtctggcag aaccgggacg tgtacctgca gggccccatc 1860
tgggccaaga ttctctcacac ggacggcaac ttccaccctg ctccgctgat gggcggtttt 1920
ggcctgaaac atcctccgcc tcagatcctg atcaagaaca cgctgtacc tgcggtacct 1980
ccgaccacct tcaaccagtc aaagctgaac tctttcatca cgcaatacag caccggacag 2040
gtcagcgtgg aaattgaatg ggagctgcag aagggaaaaca gcaagcgtg gaaccccgag 2100
atccagtaca cctccaacta ctacaaatct acaagtgtgg actttgctgt taatacagaa 2160
ggcgtgtact ctgaaccccc cccattggc acccgttacc tcacccgtaa tctg 2214

```

<210> 7

<211> 2213

<212> ADN

<213> virus adeno-asociado 8

<400> 7

```

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc 60
gagtgttggg cgtgaaacc tggagccccg aagcccaaag ccaaccagca aaagcaggac 120
gacggccggg gtctgggtgct tcctggctac aagtacctcg gaccttcaa cggactcgac 180
aagggggagc ccgtcaacgc ggcgagcga gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240
cagcagctgc aggcgggtga caatccgtac ctgcggtata accacgccga cgcgagttt 300
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag 360
gccaagaagc gggttctcga acctctcggc ctggttgagg aaggcgctaa gacggctcct 420

```

ES 2 741 502 T3

ggaaagaaga gaccggtaga gccatcaccc cagcgttctc cagactcctc tacgggcatc 480
 ggcaagaaag gccaacagcc cgccagaaaa agactcaatt ttggtcagac tggcgactca 540
 gagtcagttc cagaccctca acctctcgga gaacctccag cagcgccctc tgggtgtggga 600
 cctaatacaa tggctgcagg cgggtggcgca ccaatggcag acaataacga aggcgcccag 660
 ggagtgggta gttcctcggg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc 720
 atcaccacca gaccccgaaac ctggggccctg cccacctaca acaaccacct ctacaagcaa 780
 atctccaacg ggacatcggg aggagccacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc 840
 ccctgggggt attttgactt taacagattc cactgccact tttcaccag tgactggcag 900
 cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagagac tcagcttcaa gctcttcaac 960
 atccaggtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccaaga ccatcgccaa taacctcacc 1020
 agcaccatcc aggtgtttac ggactcggag taccagctgc cgtacgttct cggctctgcc 1080
 caccagggtc gcctgcctcc gttcccgcg gacgtgttca tgattcccca gtacggctac 1140
 ctaacactca acaacggtag tcaggccgtg ggacgctcct ccttctactg cctggaatac 1200
 tttccttcgc agatgctgag aaccggcaac aacttccagt ttacttacac cttcgaggac 1260
 gtgcctttcc acagcagcta cgcccacagc cagagcttgg accggctgat gaatcctctg 1320
 attgaccagt acctgtacta cttgtctcgg actcaaacaa caggaggcac ggcaaatacg 1380
 cagactctgg gcttcagcca aggtgggcct aatacaatgg ccaatcaggc aaagaactgg 1440
 ctgccaggac cctgttaccg ccaacaacgc gtctcaacga caaccgggca aaacaacaat 1500
 agcaactttg cctggactgc tgggaccaa taccatctga atggaagaaa ttcattggct 1560
 aatcctggca tcgctatggc aacacacaaa gacgacgagg agcgtttttt tcccagtaac 1620
 gggatcctga tttttggcaa acaaatgct gccagagaca atgaggatta cagcgatgtc 1680
 atgctcacca gcgaggaaga aatcaaaacc actaacctg tggctacaga ggaatacgg 1740
 atcgtggcag ataacttgca gcagcaaaac acggtctctc aaattggaac tgtcaacagc 1800
 cagggggcct taccgggtat ggtctggcag aaccgggacg tgtacctgca gggctccatc 1860
 tgggccaaga ttctctcacac ggacggcaac ttccaccctg ctccgctgat gggcggtttt 1920
 ggcctgaaac atcctccgcc tcagatcctg atcaagaaca cgctgtacc tgcggatcct 1980
 ccgaccacct tcaaccagtc aaagctgaac tctttcatca cgcaatacag caccggacag 2040
 gtcagcgtgg aaattgaatg ggagctgcag aaggaaaaca gcaagcgtg gaaccccgag 2100
 atccagtaca cctccaacta ctacaaatct acaagtgtgg actttgctgt aatacagaag 2160
 gcgtgtactc tgaaccccgcc ccattggca cccgttacct caccgtaat ctg 2213

<210> 8

<211> 737

<212> PRT

<213> virus adeno-asociado 8

<400> 8

ES 2 741 502 T3

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Ser	1	5	10	15
Glu	Gly	Ile	Arg	Glu	Trp	Trp	Ala	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Lys	Pro	20	25	30	
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Gln	Asp	Asp	Gly	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro	35	40	45	
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro	50	55	60	
Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp	65	70	75	80
Gln	Gln	Leu	Gln	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Asn	His	Ala	85	90	95	
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly	100	105	110	
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro	115	120	125	
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Gly	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg	130	135	140	
Pro	Val	Glu	Pro	Ser	Pro	Gln	Arg	Ser	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	Gly	Ile	145	150	155	160
Gly	Lys	Lys	Gly	Gln	Gln	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Gly	Gln	165	170	175	
Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Ser	Val	Pro	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Gly	Glu	Pro	180	185	190	
Pro	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Val	Gly	Pro	Asn	Thr	Met	Ala	Ala	Gly	Gly	195	200	205	
Gly	Ala	Pro	Met	Ala	Asp	Asn	Asn	Glu	Gly	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Ser	210	215	220	
Ser	Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	225	230	235	240

ES 2 741 502 T3

Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
 245 250 255
 Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ala Thr Asn Asp
 260 265 270
 Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
 275 280 285
 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
 290 295 300
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn
 305 310 315 320
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
 325 330 335
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
 340 345 350
 Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
 355 360 365
 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
 370 375 380
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
 385 390 395 400
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Thr Tyr
 405 410 415
 Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
 420 425 430
 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 435 440 445
 Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Asn Thr Gln Thr Leu Gly
 450 455 460
 Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly

ES 2 741 502 T3

	485		490		495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Ala Gly Thr Lys Tyr His	500		505		510
Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala Met Ala Thr	515		520		525
His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Asn Gly Ile Leu Ile	530		535		540
Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val	545		550		555
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr	565		570		575
Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Thr Ala	580		585		590
Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val	595		600		605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile	610		615		620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe	625		630		635
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val	645		650		655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe	660		665		670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu	675		680		685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr	690		695		700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Ile Gln Lys	705		710		715
Ala Cys Thr Leu Asn Pro Ala Pro Leu Ala Pro Val Thr Ser Pro Val	725		730		735
Ile					

<210> 9

5 <211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> secuencia de codificación en aa 587-595 de AAV-b

<400> 9

ES 2 741 502 T3

cctgagcgga cggcgatgag tcttccg 27

<210> 10

<211> 27

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de los aa 587-595 de AAV-h

10

<400> 10

agttttagtc gtgcggttct ttgtgat 27

REIVINDICACIONES

1. Un virus adeno-asociado (AAV) que tiene una proteína de la cápside de AAV8 recombinante que comprende SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 en los aa 587-595 de la secuencia de proteína de la cápside de AAV8 en comparación con la secuencia de la cápside vp1 tipo salvaje de AAV8 definida por la SEQ ID NO: 8.
- 5 2. El AAV según la reivindicación 1, en el que la proteína de la cápside de AAV8 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.
3. El AAV según la reivindicación 1 o 2, que comprende además un mini-gen que comprende repeticiones terminales invertidas de AAV y una secuencia de ácido nucleico heterólogo unida de forma operable a las secuencias reguladoras cuya expresión directa de un producto codificado por la secuencia de ácido nucleico heterólogo en una
 10 célula diana.
4. El AAV según la reivindicación 3, en el que las secuencias reguladoras comprenden un promotor seleccionado de un promotor específico de células bipolares; un promotor específico de células horizontales; un promotor específico de células ganglionares; y un promotor específico de la célula fotorreceptora.
5. El AAV según la reivindicación 4, en el que el promotor se selecciona del promotor EFla humano, el promotor del receptor de glutamato metabotrópico 6 (mGluR6), el promotor de rodopsina, un promotor de opsina del cono, y un
 15 promotor del factor de transcripción, opcionalmente en el que el promotor del factor de transcripción es cremallera de leucina de la retina neural (Nrl), receptor nuclear específico del fotorreceptor Nr2e3, o bZIP.
6. El AAV según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el producto codificado por la secuencia de ácido nucleico heterólogo se selecciona de rodopsina, fopsina, opsina de longitud de onda L/M, opsina de baja longitud de onda (S), canalrodopsina, halorodopsina, NYX, GRM6, TRPM1L y GPR179.
- 20 7. El AAV según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en el que los ITR son de AAV diferentes del AAV8 que proporciona la proteína de la cápside tipo salvaje y opcionalmente son de AAV2.
8. El AAV según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para usar en la prevención, detección de la progresión de, o mejora de pérdida de visión asociada con un trastorno ocular en un sujeto.
- 25 9. El AAV para usar según la reivindicación 8, en el que las células bipolares son la diana.
10. El AAV para usar según la reivindicación 8 o 9, en el que sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar retinitis pigmentosa, distrofia del bastón-cono, amaurosis congénita de Leber, síndrome de Usher, síndrome de Bardet-Biedl, enfermedad de Best, retinosquiasis, enfermedad de Stargardt dominante autosómica, enfermedad de Stargardt recesiva autosómica, desprendimiento de retina no tratado, distrofia en patrón, distrofia del cono-bastón,
 30 acromatopsia, albinismo ocular, síndrome del cono S mejorado, retinopatía diabética, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía del prematuro, retinopatía de la célula falciforme, ceguera nocturna estacionaria congénita, oclusión de la vena de la retina, glaucoma, neuropatía óptica hereditaria de Leber, trastorno de almacenamiento lisosómico o trastorno peroxisomal.
11. El AAV para usar según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el uso es en un régimen en que se administra la composición en combinación con una terapia secundaria seleccionada de una o más de una terapia del factor neurotrófico, una terapia de célula encapsulada, o una terapia anti-apoptosis; opcionalmente en la que (a) la
 35 terapia con factor neurotrófico comprende la distribución del factor derivado del epitelio pigmentario, factor neurotrófico ciliar 3, factor de viabilidad del cono derivado del bastón, o factor neurotrófico derivado de la glía; (b) la terapia de célula encapsulada comprende la distribución del factor neurotrófico ciliar, y/o (b) la terapia anti-apoptosis comprende la distribución del inhibidor unido a X de la apoptosis.
- 40 12. El AAV para usar según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el uso está en un régimen en que la composición se administra de nuevo al menos una vez en el mismo ojo y/u ojo contralateral.
13. Una célula huésped que contiene un ácido nucleico que codifica la cápside de AAV como se define en las reivindicaciones 1 o 2.
- 45 14. Una composición que comprende el AAV según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y un vehículo fisiológicamente compatible.

[illegible]

FIG 1B

AAV1_VP1	436	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550
AAV2_VP1	435		S.N.TP	TTTOSR	Q	QAGSIRD	SR	SA	EYS	T.H	D.LV	P
AAV3_VP1	435		GTT	TTNOSR	QAG	OS	LAR	L	AN	P.A	H	D.LV
AAV3E_VP1	435		GTT	TTNOSR	QAG	OS	LAR	L	AN	P.A	H	D.LV
AAV4_VP1	439		WG	OS	TTGTTIN	GTATTN	TKLR	TNF	NFK	SIK	GF	ANQ
AAV6_VP1	436											
AAV7_VP1	437		A	S	FG	T	G	RE	Q	YQ	G	ST
AAV8_VP1	438		S	TT	G	T	NTQT	G	Q	G	NT	AN
AAV1_VP1	540	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660
AAV2_VP1	539	L	OGSENT	VDIEK		RT		QY	S	ST		
AAV3_VP1	540	NL	GTT	AE		RT		QY	N	A	T	T
AAV3E_VP1	540	NL	GTT	AE		RT		QY	N	A	T	T
AAV4_VP1	538	LIFA	PKON	NTA	VPGTILF	S	LA	ATD	DMN	NLPGG	N	NL
AAV6_VP1	540											
AAV7_VP1	542	L	KTGATNK	T	E	LM	N	RP				
AAV8_VP1	542	IL	QN	ARD	ADYSD	L	S	T				
AAV1_VP1	650	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770
AAV2_VP1	649		STT	A								
AAV3_VP1	650		TT	PA								
AAV3E_VP1	650		TT	PA								
AAV4_VP1	648		ATT	S	PVN		Q	D	I	R		
AAV6_VP1	650											
AAV7_VP1	651		EV	TPA								
AAV8_VP1	652		D	TT	NQS	LN						

FIGURA 2

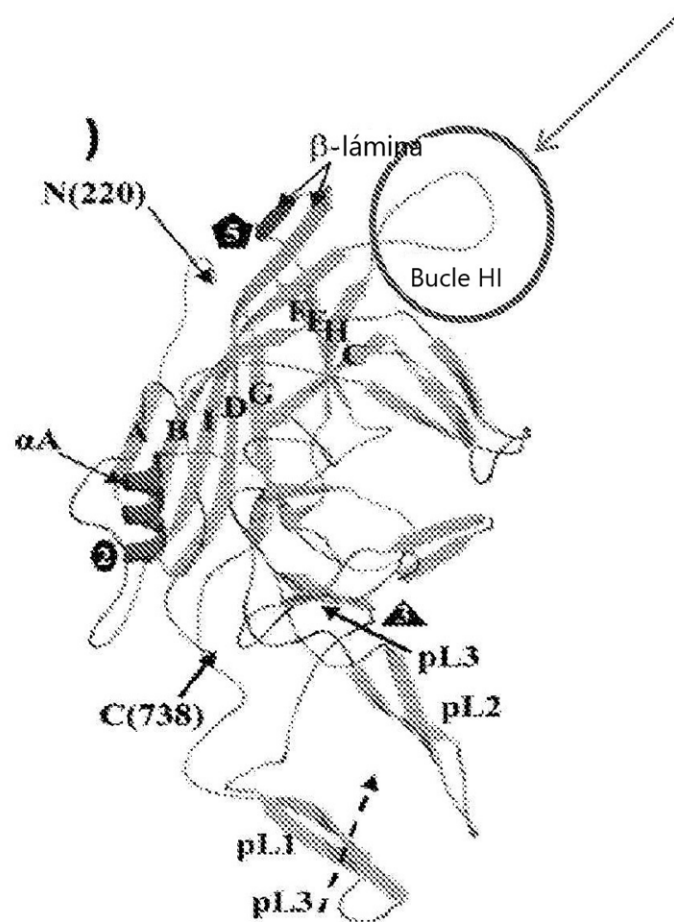


FIGURA 3

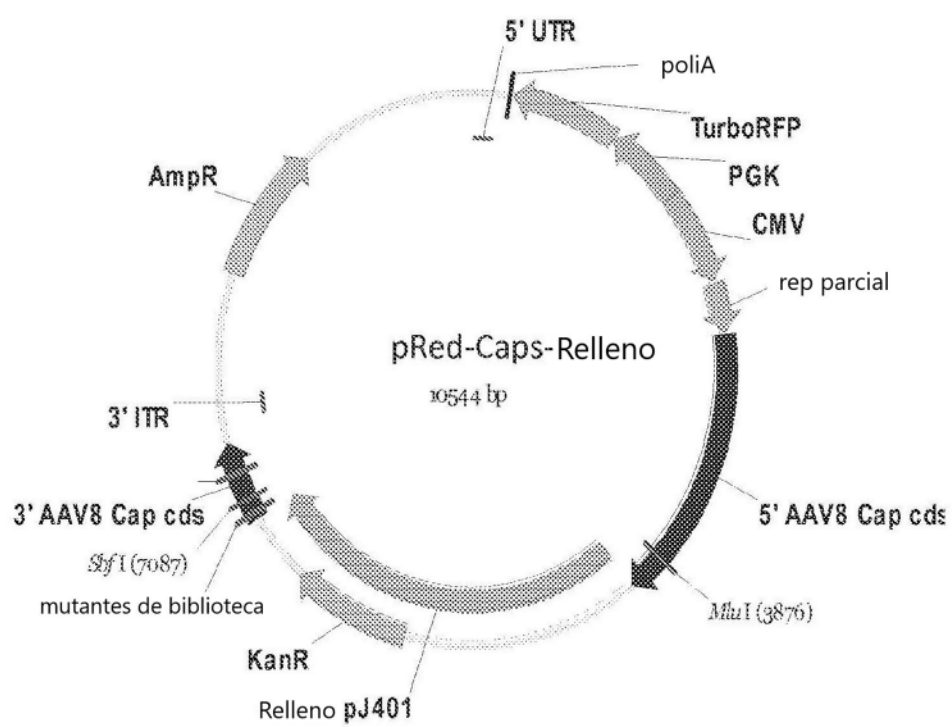
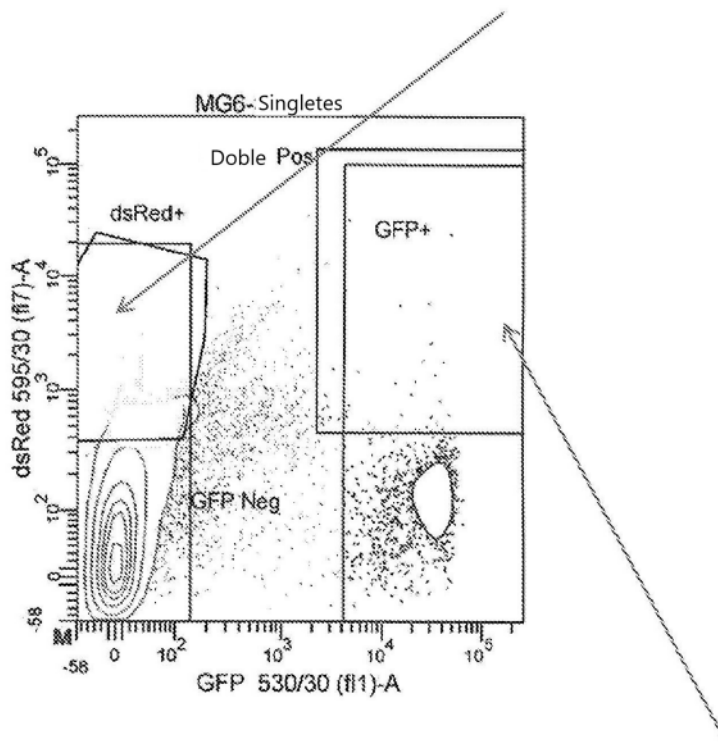


FIGURA 4

Todos los no bipolares transfectados con AAV:

(Positivo para dsRED solo: 9,1% de población parental)



Bipolares ON transfectados con AAV:

(Doble positivo para dsRED y GFP: 1% de población parental)

FIGURA 5

(de aa585)										SEQ ID NO:
TS	CAG	CAG	CAA	AAC	ACG	GCT	CCT	CAA	ATT	<u>16</u>
	Gln	Gln	Gln	Asn	Thr	Ala	Pro	Gln	Ile	<u>11</u>
	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	(<i>P</i>)	(<i>N</i>)	<i>P</i> [^]	<i>P</i>	(<i>N</i>) [*]	
Var 1	TAT	CTT	ATG	CGT	TAT	ATT	GGT	GTT	TTT	<u>17</u>
	Tyr	Leu	Met	Arg	Tyr	Ile	Gly	Gly	Phe	<u>12</u>
	<i>P</i>	<i>N</i> [*]	<i>N</i> [*]	<i>B</i> [^]	<i>P</i>	(<i>N</i>) [*]	<i>N</i>	<i>N</i>	<i>N</i> [*]	
Var 2	CCT	GAG	CGG	ACG	GCG	ATG	AGT	CTT	CCG	<u>18</u>
	Pro	Glu	Arg	Thr	Ala	Met	Ser	Leu	Pro	<u>1</u>
	<i>P</i> [^]	<i>A</i>	<i>B</i> [^]	<i>N</i>	<i>N</i>	<i>N</i> [*]	<i>P</i>	<i>N</i> [*]	<i>P</i> [^]	
Var 3	AGT	TTT	AGT	CGT	GCG	GTT	CTT	TGT	GAT	<u>19</u>
	Ser	Phe	Ser	Arg	Ala	Val	Leu	Cys	Asp	<u>2</u>
	<i>P</i>	<i>N</i> [*]	<i>P</i>	<i>B</i> [^]	<i>N</i>	<i>N</i> [*]	<i>N</i> [*]	<i>P</i>	<i>A</i>	
Var 4	CAT	TGT	GTG	GAT	TGT	TGT	GCG	TCT	TAT	<u>20</u>
	His	Cys	Val	Asp	Cys	Cys	Ala	Ser	Tyr	<u>13</u>
	<i>B</i> [^]	<i>P</i>	<i>N</i> [*]	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	
Var 5	CAT	ACT	GAG	TAT	ATG	AGT	GAG	TAG	CTC	<u>21</u>
	His	Thr	Glu	Tyr	Met	Ser	Glu	!!!!	Leu	<u>14</u>
	<i>B</i> [^]	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>N</i> [*]	<i>P</i>	<i>A</i>	<i>parada</i>	<i>N</i> [*]	
Var 6	CCG	ATT	TTT	GTT	GGG	TGT	TCT	GTG	CTT	<u>22</u>
	Pro	Ile	Phe	Val	Gly	Cys	Ser	Val	Leu	<u>15</u>
	<i>P</i> [^]	(<i>N</i>) [*]	<i>N</i> [*]	<i>N</i> [*]	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>P</i>	<i>N</i> [*]	<i>N</i> [*]	

FIGURA 6

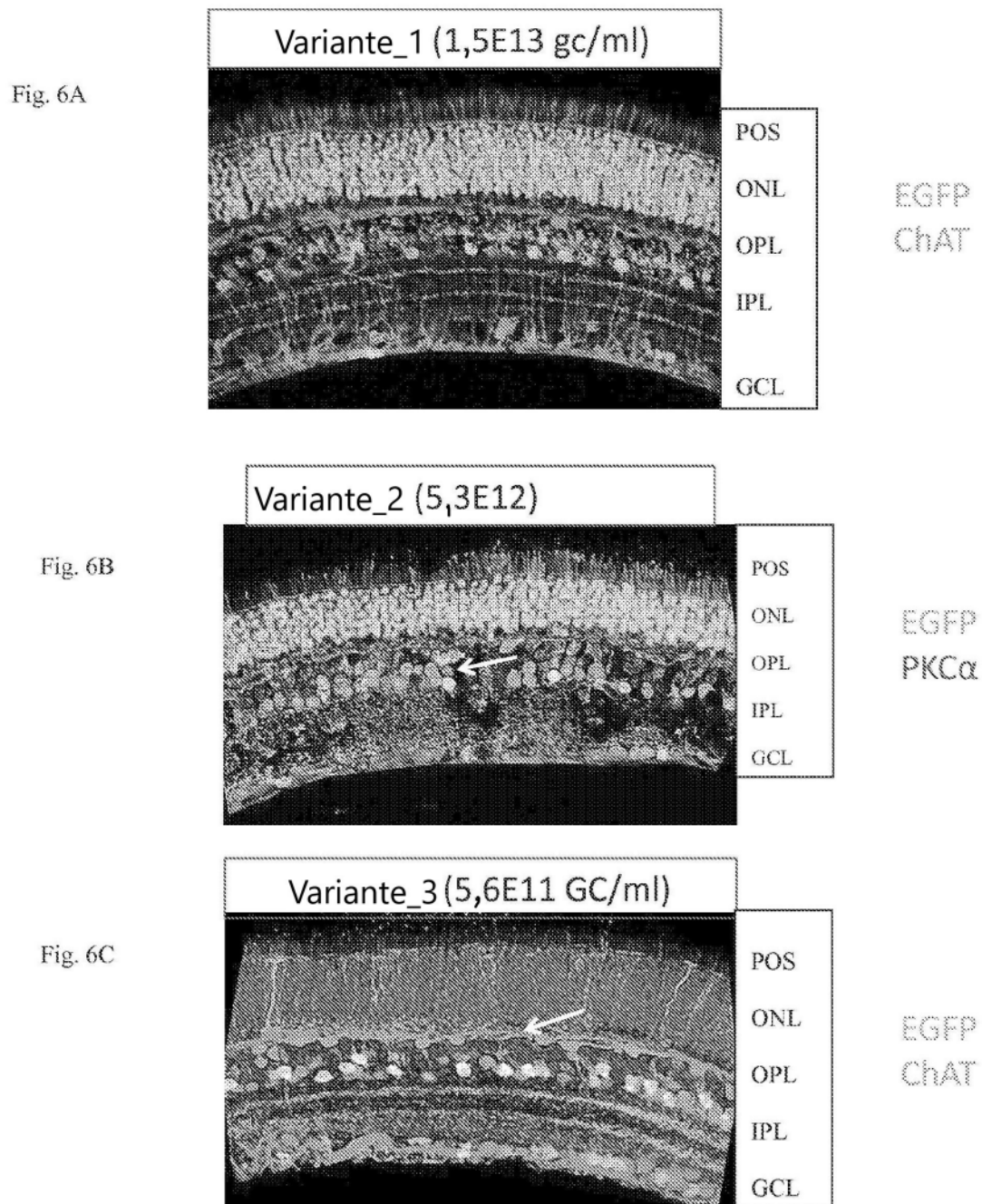
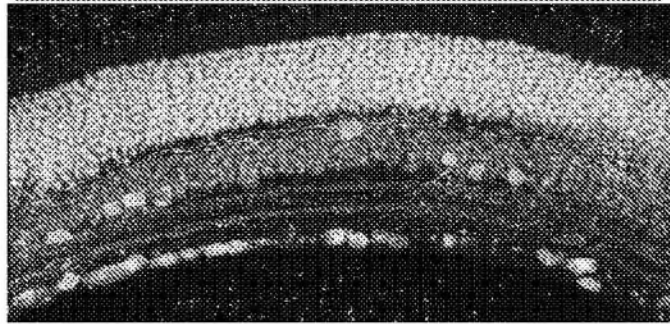


Fig. 6D

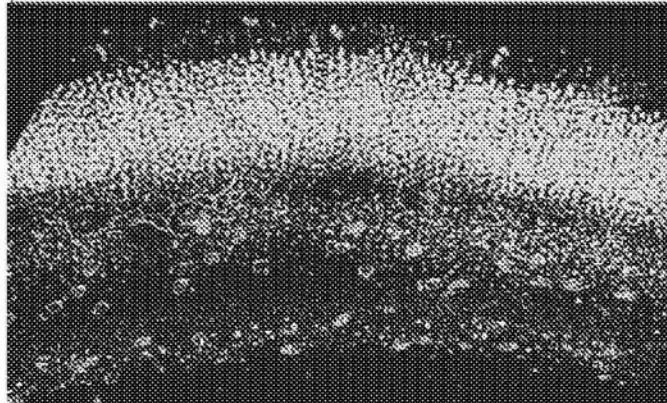
Variante_4 (3,8E10)



EGFP
ChAT

Fig. 6E

Variante_5 (1,4 E8 GC/ml)



EGFP
ChAT
PKCα

POS: Segmentos externos del fotorreceptor; ONL: Capa nuclear externa; OPL: Capa plexiforme externa; IPL: Capa plexiforme interna; GCL: Capa de células ganglionares

FIGURA 7

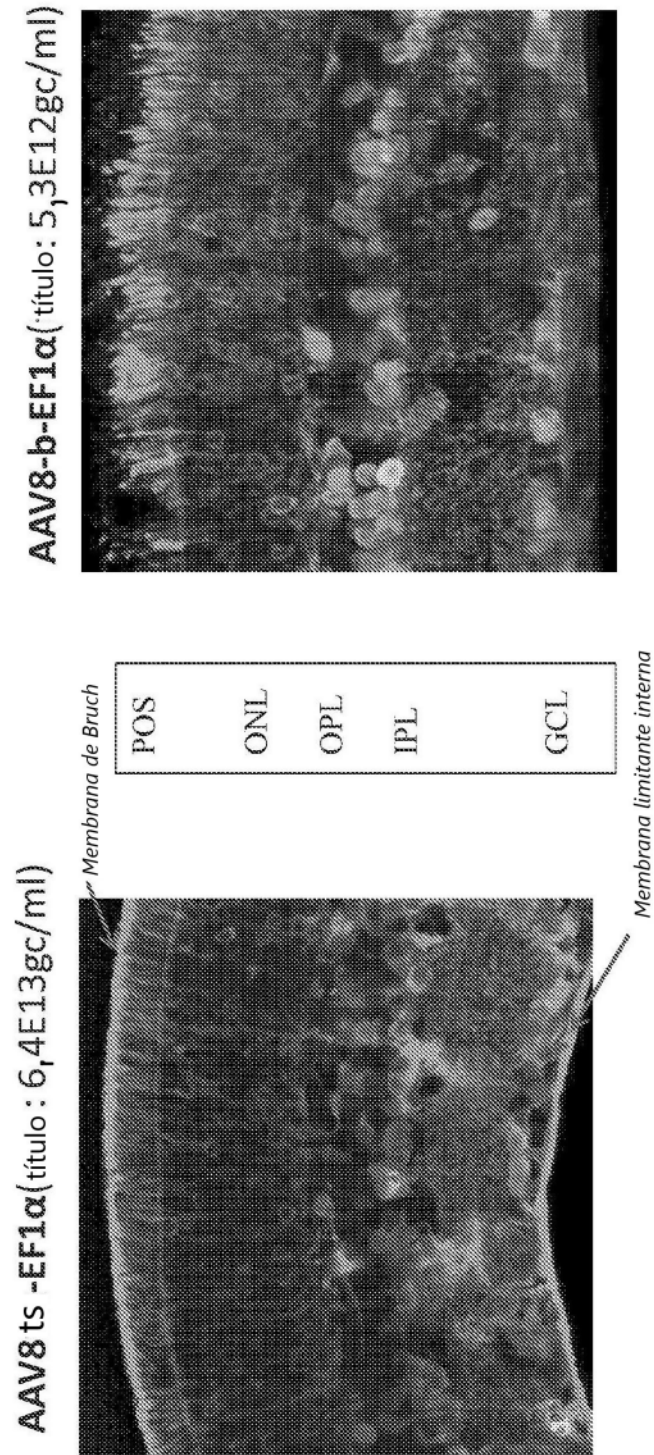


Fig. 8

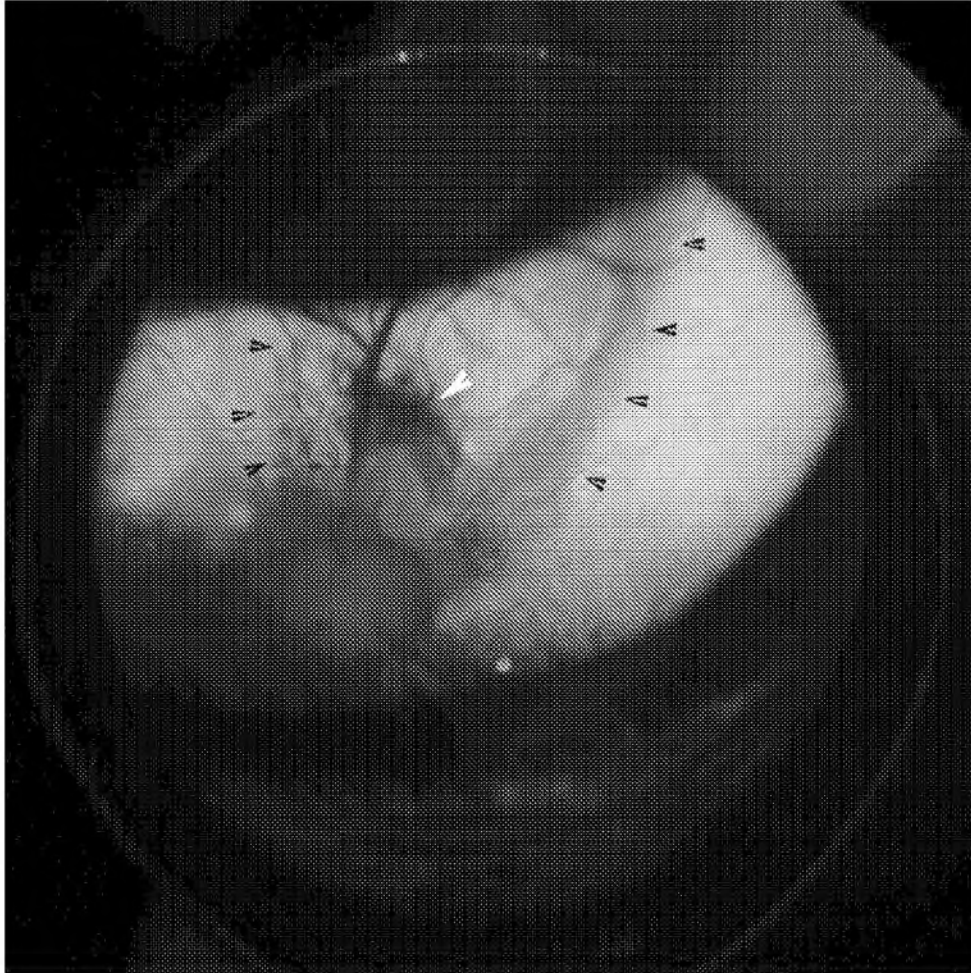


FIG. 9

Fig. 9A

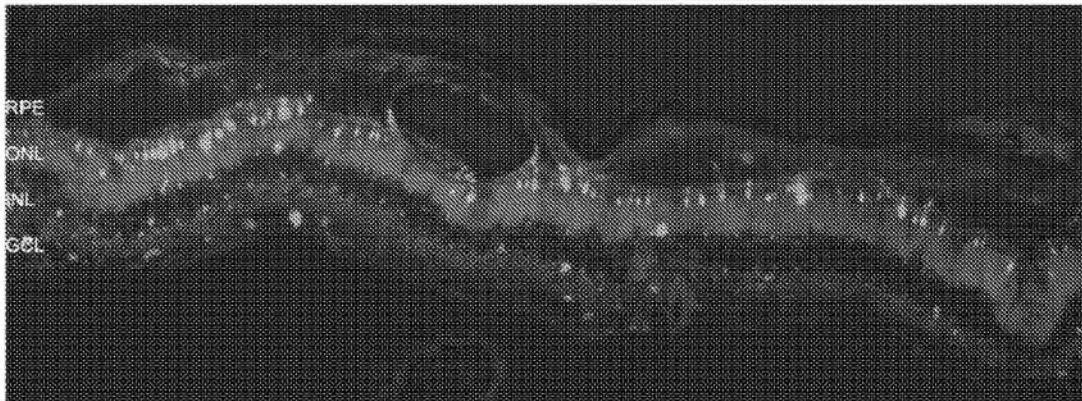


Fig. 9B

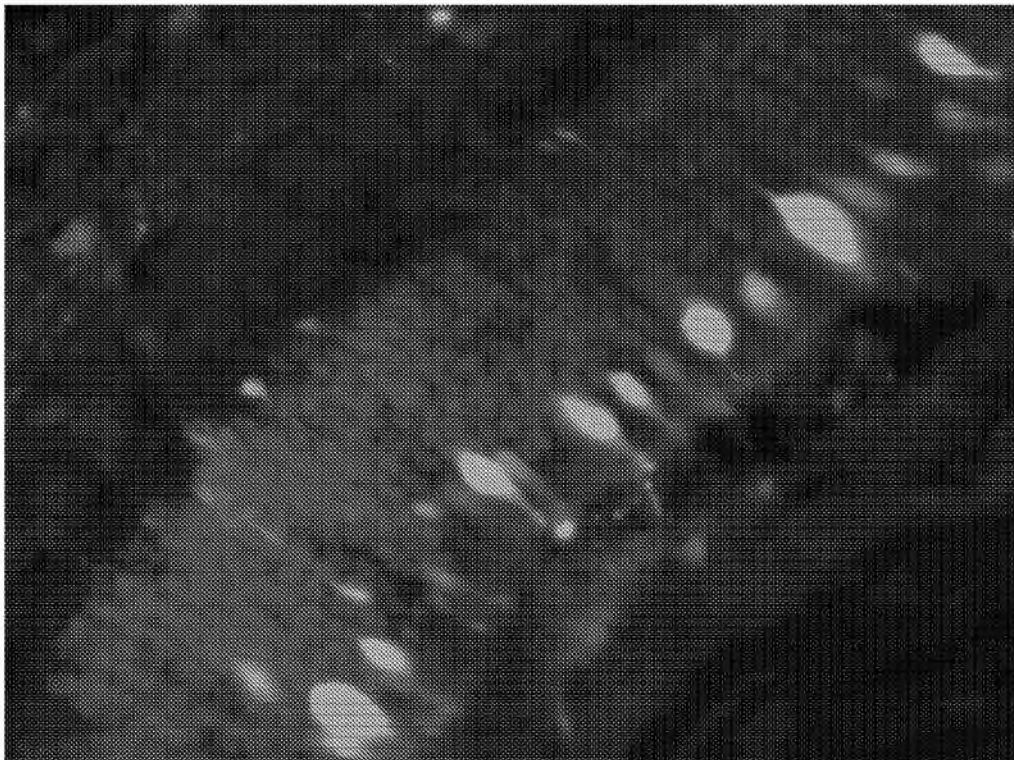


FIG. 10

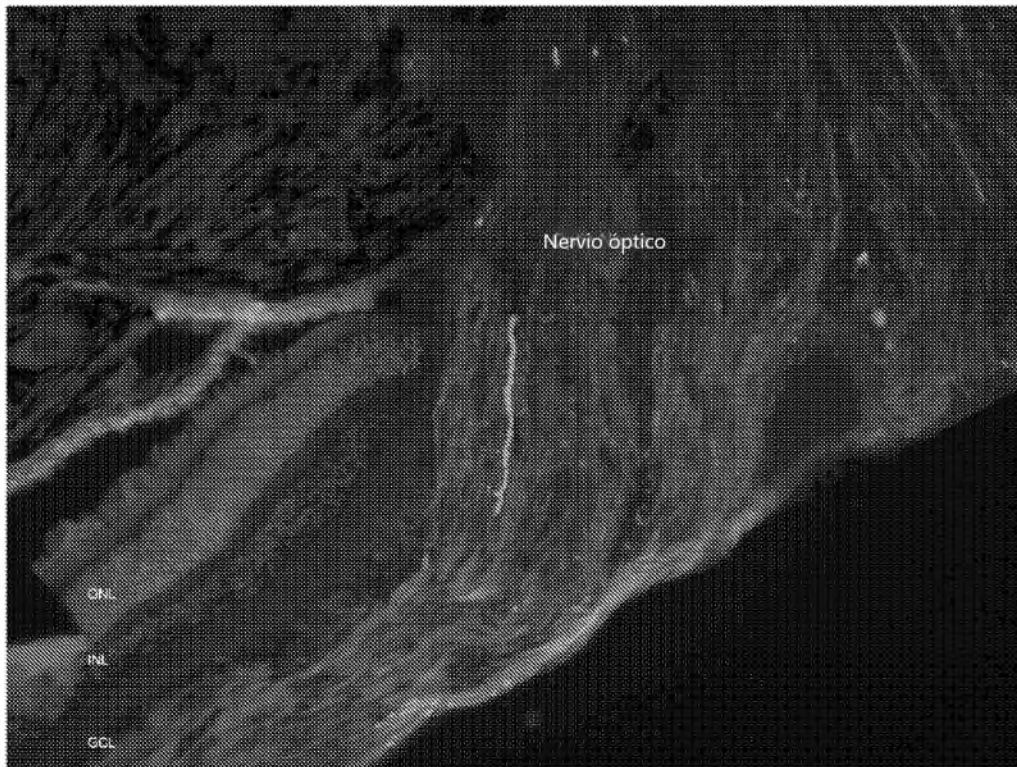


FIGURA 11 1

Fig. 11A

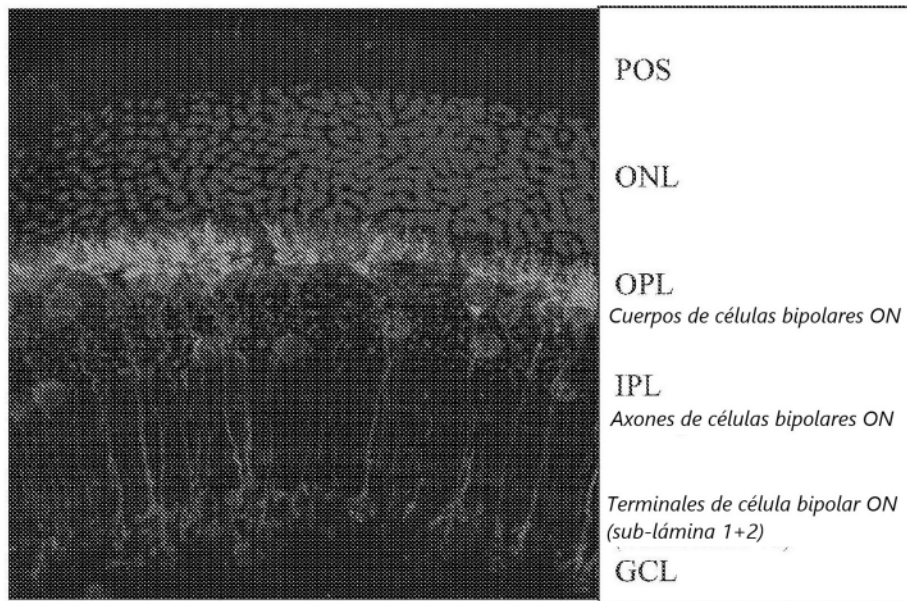


Fig. 11B

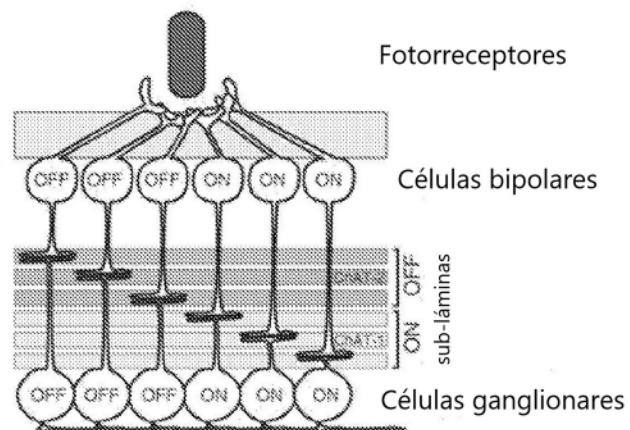


Fig. 12A

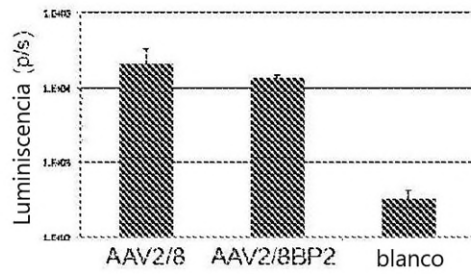


Fig. 12B

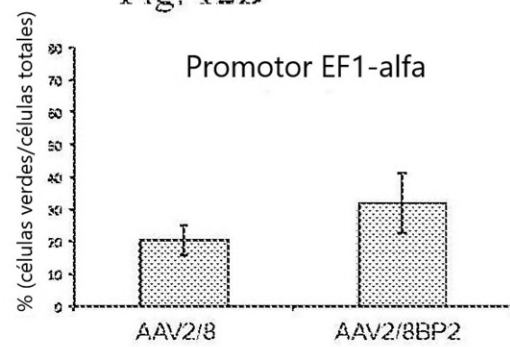


Fig. 12C

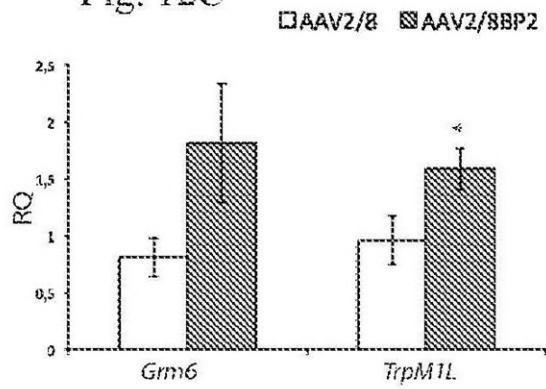


Fig. 12D

