

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 763**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.03.2015 PCT/US2015/018791**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015 WO15134643**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2015 E 15758026 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3113787**

54 Título: **Vectores rAAV mejorados y métodos para la transducción de fotorreceptores y células EPR**

30 Prioridad:

**04.03.2014 US 201461947940 P**

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

**23.06.2020**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH  
FOUNDATION, INC. (100.0%)  
223 Grinter Hall  
Gainesville, FL 32611, US**

72 Inventor/es:

**BOYE, SHANNON, E.;  
BOYE, SANFORD, L.;  
AGBANDJE-MCKENNA, MAVIS y  
SRIVASTAVA, ARUN**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 768 763 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

Vectores rAAV mejorados y métodos para la transducción de fotorreceptores y células EPR

5 **DECLARACIÓN CON RESPECTO A LA INVESTIGACIÓN O DESARROLLO CON FONDOS FEDERALES**

La presente invención se realizó con apoyo gubernamental en virtud de las subvenciones número P30EY021721, GM082946 y A11081961 otorgadas por los National Institutes of Health. El gobierno posee ciertos derechos sobre la presente invención.

10

**Campo de la divulgación**

La presente divulgación se refiere generalmente a los campos de la biología molecular y la virología, y en particular, al desarrollo de vehículos de administración génica.

15

**Antecedentes de la divulgación**

Los grandes avances en el campo de la terapia génica se han logrado usando virus para suministrar material genético terapéutico. El virus adenoasociado (AAV) ha atraído una atención considerable como un vector viral altamente eficaz para la terapia génica debido a su baja inmunogenicidad y capacidad para transducir de manera eficaz células que no se encuentran en división. Se ha demostrado que los AAV infectan a varios tipos de células y tejidos y se han hecho avances significativos durante la última década para adaptar este sistema viral para su uso en terapia génica humana.

20

En esta forma de "tipo silvestre" normal, el ADN de AAV recombinante se empaqueta en la cápside viral en forma de una molécula monocatenaria de aproximadamente 4600 nucleótidos (nt) de longitud. Después de la infección de las células por el virus, la maquinaria molecular de la célula convierte el ADN monocatenario en una forma bicatenaria. Solo esta forma de ADN bicatenario puede ser transcrita por enzimas celulares en ARN, que después se traduce en polipéptidos por vías celulares adicionales.

25

El AAV (rAAV) tiene muchas propiedades que favorecen su uso como vehículo de administración génica: 1) el virus de tipo silvestre no se asocia con ninguna afección patológica humana; 2) la forma recombinante no contiene secuencias codificantes virales nativas; y 3) se ha observado una expresión transgénica persistente en diversas células de mamífero, facilitando su uso en muchas aplicaciones basadas en terapia génica.

30

Los vectores AAV recombinantes se conocen, entre otros, a partir del documento EP 1 486 567 A1, WO 2010/093784 A2, WO 2007/089632 A2, US 2014/0050701 A1 y WO 2010/011404 A2.

35

La eficacia de la transducción de los vectores AAV varía enormemente en diferentes células y tejidos, *in vitro* e *in vivo*, lo que de hecho limita su utilidad en ciertos regímenes de terapia génica. Se han realizado estudios sistemáticos para dilucidar las etapas fundamentales en el ciclo de vida del AAV. Por ejemplo, se ha documentado que una proteína celular, FKBP52, fosforilada en los residuos de tirosina por la proteína tirosina cinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR-PTK), inhibe la síntesis de la segunda hebra de ADN de AAV y, por consiguiente, la expresión del transgén *in vitro*, así como *in vivo*. También se ha demostrado que la señalización de EGFR-PTK modula el tráfico intracelular mediado por la vía de ubiquitina/proteasoma, así como la síntesis de la segunda hebra de ADN mediada por FKBP52 de los vectores AAV. En esos estudios, la inhibición de EGFR-PTK ocasionó una ubiquitinación reducida de las proteínas de la cápside de AAV, lo que a su vez, facilitó el transporte nuclear limitando la degradación mediada por el proteasoma de vectores AAV, lo que implica la fosforilación mediada por EGFR-PTK de los residuos de tirosina de las cápsides de AAV.

40

45

De lo que carece la técnica anterior es de los vectores virales rAAV "de próxima generación" mejorados que demuestran eficiencias de transducción mejoradas al infectar células de mamífero objetivo, tales como fotorreceptores y células del epitelio pigmentario de la retina del ojo humano. El desarrollo de dichos vectores, así como las formulaciones farmacéuticas que facilitan su administración a sujetos mamíferos serán un avance importante en el tratamiento de enfermedades y trastornos oculares, y un paso significativo en la realización del tratamiento de dichas afecciones usando terapias génicas basadas en virus.

50

55

**Breve resumen de la divulgación**

La presente divulgación supera estas y otras limitaciones inherentes a la técnica anterior al proporcionar nuevas partículas y vectores de rAAV que son capaces de, y están optimizados para, transducir uno o más fotorreceptores de mamífero y/o células del epitelio pigmentario de la retina de mamífero después de la administración de las partículas virales, a un ojo de mamífero. La presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas y se refiere a: partículas virales adenoasociadas recombinantes (rAAV); vectores de ácido nucleico que codifican una proteína de la cápside modificada; partículas de rAAV para su uso al proporcionar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico seleccionado; partículas de rAAV para su uso en el tratamiento o mejora de uno o más síntomas de una enfermedad, un trastorno, una disfunción, una lesión, una afección anormal, o un traumatismo en un mamífero;

60

65

y partículas de rAAV para su uso en medicina, en las que las partículas de rAAV se administran por vía subretiniana o intravítrea en uno o ambos ojos de un mamífero. Las realizaciones de la presente invención se describirán ahora en los siguientes párrafos numerados:

5 (1). Una partícula viral recombinante adenoasociada (rAAV) que comprende:  
una proteína de la cápside modificada, en la que la proteína de la cápside modificada comprende una o más  
sustituciones de aminoácidos no nativos en las posiciones correspondientes a uno o más residuos de aminoácidos  
expuestos a la superficie de unión a sulfato de heparina de una proteína de la cápside de AAV2 de tipo silvestre  
10 como se expone en la SEQ ID NO: 2; o a residuos de aminoácidos correspondientes a las mismas en una  
cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o  
AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5,  
SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10, en la que las sustituciones de aminoácidos no  
nativos tienen lugar en los residuos de aminoácidos:

15 (a) Y444, T491, Y500, R585, R588, R487, e Y730;

(b) Y444, T491, Y500, R585, e Y730;

20 (c) Y444, T491, Y500, R588, e Y730;

(d) Y444, T491, Y500, R585, R588, e Y730;

(e) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588, R487, e Y730;

25 (f) Y444, T491, Y500, E530, R585, e Y730;

(g) Y444, T491, Y500, E530, R588, e Y730; o

(h) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588, e Y730

30 de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o en las posiciones de  
aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo  
silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la  
SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ  
35 ID NO: 10.

(2). Un vector de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside modificada, en el que la proteína de la  
cápside modificada comprende una o más sustituciones de aminoácidos no nativos en las posiciones  
correspondientes a uno o más residuos de aminoácidos expuestos a la superficie de unión a sulfato de heparina  
40 de una proteína de la cápside de AAV2 de tipo silvestre como se expone en la SEQ ID NO: 2; o a residuos de  
aminoácidos correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de  
AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO:  
1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10,  
en la que las sustituciones de aminoácidos no nativos tienen lugar en los residuos de aminoácidos:

45 (a) Y444, T491, Y500, R585, R588, R487, e Y730;

(b) Y444, T491, Y500, R585, e Y730;

50 (c) Y444, T491, Y500, R588, e Y730;

(d) Y444, T491, Y500, R585, R588, e Y730;

(e) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588, R487, e Y730;

55 (f) Y444, T491, Y500, E530, R585, e Y730;

(g) Y444, T491, Y500, E530, R588, e Y730; o

(h) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588, e Y730

60 de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o en las posiciones de  
aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo  
silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la  
65 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ  
ID NO: 10.

- (3). La partícula de rAAV del párrafo 1 o el vector de ácido nucleico del párrafo 2, en la que la proteína de la cápside modificada comprende además una o más sustituciones de aminoácidos no nativos en las posiciones correspondientes a uno o más residuos de tirosina y/o treonina expuestos a la superficie de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2; o a residuos de tirosina correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.
- (4). La partícula de rAAV de los párrafos 1 o 3, o el vector de ácido nucleico de los párrafos 2 o 3, en la que las sustituciones de aminoácidos no nativos comprenden:
- (a) Y444F, T491V, Y500F, R585S, R588T, R487G, e Y730F;
  - (b) Y444F, T491V, Y500F, R585S, e Y730F;
  - (c) Y444F, T491V, Y500F, R588T, e Y730F;
  - (d) Y444F, T491V, Y500F, R585S, R588T, e Y730F;
  - (e) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, R588T, R487G, e Y730F;
  - (f) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, e Y730F;
  - (g) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R588T, e Y730F; o
  - (h) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, R588T, e Y730F de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o en las posiciones de aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.
- (5). La partícula de rAAV de uno cualquiera de los párrafos 1, 3, o 4, o el vector de ácido nucleico de los párrafos 2 a 5, en la que la eficiencia de transducción de la partícula es de 2 a 50 veces mayor en el uno o más fotorreceptores (PR) o células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) que la de una partícula que comprende una proteína de la cápside de tipo silvestre no modificada correspondiente.
- (6). La partícula de rAAV de uno cualquiera de los párrafos 1 y 3 a 5, en la que la partícula comprende un polinucleótido que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica una molécula de diagnóstico o terapéutica unida operativamente a un promotor que es capaz de expresar el segmento de ácido nucleico en una o más células fotorreceptoras o del epitelio pigmentario de la retina de un ojo de mamífero; opcionalmente en la que el segmento de ácido nucleico comprende además un potenciador, una secuencia reguladora postranscripcional, una señal de poliadenilación, o cualquier combinación de los mismos, unidos operativamente al segmento de ácido nucleico que codifica el agente terapéutico.
- (7). La partícula de rAAV del párrafo 6, en la que el segmento de ácido nucleico se expresa o se codifica en una o más células fotorreceptoras o células EPR de un ojo de mamífero, un polipéptido, un péptido, una ribozima, un ácido nucleico peptídico, un ARNip, un ARNi, un oligonucleótido antisentido, un polinucleótido antisentido, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, o cualquier combinación de los mismos.
- (8). Una partícula de rAAV para su uso en medicina, en la que la partícula de rAAV de uno cualquiera de los párrafos 1 o 3 a 7 se usa para transducir una célula fotorreceptora de mamífero o una célula del epitelio pigmentario de la retina, en la que la partícula de rAAV se administra a uno o ambos ojos del mamífero; opcionalmente en la que la partícula de rAAV se administra por vía intravítrea o subretiniana.
- (9). Una partícula de rAAV para su uso al proporcionar a un mamífero que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico seleccionado, en la que una cantidad de la partícula de rAAV del párrafo 6 o 7 se administra a uno o ambos ojos del mamífero; y durante un tiempo eficaz para proporcionar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico seleccionado; opcionalmente en la que la partícula de rAAV se administra por vía intravítrea o subretiniana.
- (10). Una partícula de rAAV para su uso en el tratamiento o mejora de uno o más síntomas de una enfermedad, un trastorno, una disfunción, una lesión, una afección anormal, o un traumatismo en un mamífero, en la que la partícula de rAAV de uno cualquiera de los párrafos 1 o 3 a 7 se administra por vía intravítrea o subretiniana a uno o ambos ojos del mamífero que lo necesita, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para tratar o mejorar el uno o más síntomas de la enfermedad, el trastorno, la disfunción, la lesión, la afección anormal, o el traumatismo

en el mamífero.

(11). Una partícula de rAAV para su uso en medicina, en la que la partícula de rAAV de uno cualquiera de los párrafos 1 o 3 a 7 se administra: por vía subretiniana o intravítrea a uno o ambos ojos del mamífero, en la que la partícula de rAAV comprende un polinucleótido que comprende al menos un primer polinucleótido que comprende un promotor específico de células PR o EPR unido operativamente al menos a un primer segmento de ácido nucleico que codifica un agente terapéutico, durante un tiempo eficaz para expresar el agente terapéutico en una o más células PR o células RPE del mamífero; opcionalmente en la que el mamífero es humano; y además, opcionalmente, el ser humano es un neonato, un recién nacido, un bebé o un joven.

(12). La partícula de rAAV del párrafo 11, en la que cuando el mamífero es humano, el ser humano tiene, se sospecha que tiene, está en riesgo de desarrollar, o ha sido diagnosticado con un trastorno de la retina, una enfermedad de la retina, una distrofia de la retina, o cualquier combinación de los mismos; opcionalmente en la que el trastorno de la retina, la enfermedad de la retina, o la distrofia de la retina es hereditaria.

(13). La partícula de rAAV de uno cualquiera de los párrafos 11 o 12, en la que la producción del agente terapéutico a) conserva una o más células fotorreceptoras o una o más células EPR, b) restaura una o más funciones mediadas por bastones y/o conos, c) restaura el comportamiento visual en uno o ambos ojos, o d) cualquier combinación de los mismos.

(14). La partícula de rAAV de uno cualquiera de los párrafos 11 a 13, en la que la producción del agente terapéutico persiste en una o más células fotorreceptoras o en una o más células EPR sustancialmente durante un periodo de al menos tres meses después de una administración inicial de la partícula de rAAV en el uno o ambos ojos del mamífero; opcionalmente en la que la producción del agente terapéutico persiste en la una o más células retinianas sustancialmente durante un periodo de al menos seis meses después de una administración inicial de la partícula de rAAV en uno o ambos ojos del mamífero.

(15). La partícula de rAAV de uno cualquiera de los párrafos 11 a 14, en la que el agente terapéutico es un agonista, un antagonista, un factor antiapoptosis, un inhibidor, un receptor, una citocina, una citotoxina, un agente eritropoyético, una glucoproteína, un factor de crecimiento, un receptor del factor de crecimiento, una hormona, un receptor hormonal, un interferón, una interleucina, un receptor de interleucina, un factor de crecimiento nervioso, un péptido neuroactivo, un receptor de péptido neuroactivo, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una proteína descarboxilasa, una proteína cinasa, un inhibidor de proteína cinasa, una enzima, una proteína de unión al receptor, una proteína de transporte o un inhibidor de la misma, un receptor de serotonina, o un inhibidor de captación de la misma, una serpina, un receptor de serpina, un supresor tumoral, un quimioterapéutico, o cualquier combinación de los mismos.

Ventajosamente, las nuevas partículas de rAAV, vectores, construcciones de expresión, viriones infecciosos y pluralidades de partículas virales divulgadas en el presente documento, en algunas opciones, tienen una eficacia mejorada en la transducción de una o más células retinianas del ojo de mamífero, y en particular, una eficacia mejorada en la transducción de uno o más fotorreceptores (PR) o células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) del ojo humano.

Las partículas y vectores mutados en la cápside de rAAV mejorados contenidos en las mismas descritas en el presente documento, en algunas opciones, pueden transducir células PR o EPR de mamífero a eficiencias más altas (y a menudo, eficiencias mucho más altas) que los vectores rAAV no modificados correspondientes (es decir, "de tipo silvestre"). Al emplear partículas de rAAV modificadas que comprenden proteínas de la cápside modificada que contienen tres, cuatro, cinco, seis o siete o más residuos de aminoácidos expuestos a la superficie sustituidos con aminoácidos no nativos, los inventores han desarrollado una colección de partículas de rAAV multimutadas que pueden encapsular vectores que contienen uno o más promotores específicos de las células, cada uno unido operativamente a un segmento de ácido nucleico que codifica uno o más agentes de diagnóstico o terapéuticos. Las nuevas construcciones de vectores descritas en el presente documento tienen propiedades mejoradas, y son capaces de realizar una transducción de células PR y/o EPR de mayor eficiencia que los vectores parentales no sustituidos (es decir, no modificados) correspondientes a partir de los cuales se prepararon los vectores mutantes.

La presente divulgación proporciona partículas y vectores basados en AAV2 para la administración eficaz de transgenes a fotorreceptores y/o el epitelio pigmentario de la retina (EPR) después de la inyección subretiniana. La divulgación también proporciona partículas y vectores basados en AAV2 para la administración eficaz de transgenes a fotorreceptores y/o el epitelio pigmentario de la retina (EPR) después de la inyección intravítrea. En una opción a modo de ejemplo, la partícula modificada de la cápside "AAV2MAXΔHS" descrita en el presente documento transduce las células de la retina externa (fotorreceptores y EPR) de manera mucho más eficiente que el AAV2 no modificado de tipo silvestre. Los niveles de expresión transgénica logrados con esta partícula estaban a la par con los alcanzados por otros dos serotipos de AAV que se usan más comúnmente para administrar el transgén a estas células: AAV5 y AAV8.

La capacidad de transducir fotorreceptores/EPR después de la inyección intravítrea es un objetivo muy buscado en el

campo. Las partículas y vectores basados en AAV2 con afinidad por HS modulada descrita en el presente documento logran dichos objetivos. Además, minimizan drásticamente los riesgos quirúrgicos asociados con la inyección subretiniana, reducen significativamente el coste de la atención, aumentan drásticamente la accesibilidad de las terapias genéticas, y simplifican en gran medida el proceso quirúrgico actual, al convertir una cirugía mayor en un procedimiento ambulatorio de rutina.

En algunos aspectos, la divulgación proporciona una partícula viral recombinante adenoasociada (rAAV) que comprende una proteína de la cápside modificada, en la que la proteína de la cápside modificada comprende una o más sustituciones de aminoácidos no nativos (por ejemplo, una o más serinas, treoninas, o glicinas, o una combinación de las mismas) en las posiciones correspondientes a uno o más residuos de aminoácidos expuestos a la superficie de unión a sulfato de heparina (por ejemplo, una o más argininas expuestas a la superficie) de una proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2; o a residuos de aminoácidos correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10. En algunas opciones, las sustituciones de aminoácidos no nativos se producen en una o más (por ejemplo, una, dos o tres) posiciones correspondientes a una o más de: R585, R588, y R487 (por ejemplo, R585, R588, R487, R585 + R588, R585 + R487, R588 + R487, o R585 + R588 + R487) de una proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o a los residuos de aminoácidos correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.

En algunas opciones de una cualquiera de las partículas de rAAV descritas en el presente documento, la proteína de la cápside modificada comprende además una o más sustituciones de aminoácidos no nativos (por ejemplo, fenilalanina o valina) en las posiciones correspondientes a uno o más residuos de tirosina y/o treonina expuestos a la superficie de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2; o a residuos de tirosina correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10. En algunas opciones, las sustituciones de aminoácidos no nativos se producen en una o más (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro) posiciones correspondientes a una o más de: Y444, T491, Y500, e Y730 de una proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o a los residuos de aminoácidos correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.

En algunas opciones de una cualquiera de las partículas de rAAV descritas en el presente documento, la proteína de la cápside modificada comprende además una sustitución no nativa (por ejemplo, una lisina) en una posición que corresponde a E530 de una proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o a los residuos de aminoácidos correspondientes a la misma en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.

En algunas opciones de una cualquiera de las proteínas de la cápside modificada descritas en el presente documento, las sustituciones de aminoácidos no nativos se producen en los residuos de aminoácidos: (a) Y444, T491, Y500, R585, R588, R487, e Y730; (b) Y444, T491, Y500, R585, e Y730; (c) Y444, T491, Y500, R588, e Y730; (d) Y444, T491, Y500, R585, R588, e Y730; (e) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588, R487, e Y730; (f) Y444, T491, Y500, E530, R585, e Y730; (g) Y444, T491, Y500, E530, R588, e Y730; o (h) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588, e Y730 de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o en las posiciones de aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.

En algunas opciones, en las que las sustituciones de aminoácidos no nativos comprenden: (a) Y444F, T491V, Y500F, R585S, R588T, R487G, e Y730F; (b) Y444F, T491V, Y500F, R585S, e Y730F; (c) Y444F, T491V, Y500F, R588T, e Y730F; (d) Y444F, T491V, Y500F, R585S, R588T, e Y730F; (e) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, R588T, R487G, e Y730F; (f) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, e Y730F; (g) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R588T, e Y730F; o (h) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, R588T, e Y730F de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o en las posiciones de aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.

En algunas opciones de una cualquiera de las partículas de rAAV descritas en el presente documento, la eficiencia de

transducción de la partícula es aproximadamente de 2 a aproximadamente 50 veces mayor en la una o más células fotorreceptoras o EPR que la de una partícula que comprende una proteína de la cápside de tipo silvestre no modificada correspondiente.

5 En algunas opciones de una cualquiera de las partículas de rAAV descritas en el presente documento, la partícula comprende un polinucleótido que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica una molécula de diagnóstico o terapéutica unida operativamente a un promotor que es capaz de expresar el segmento de ácido nucleico en una o más células fotorreceptoras o del epitelio pigmentario de la retina de un ojo de mamífero. En algunas opciones, el segmento de ácido nucleico comprende además un potenciador, una secuencia reguladora postranscripcional, una  
10 señal de poliadenilación, o cualquier combinación de los mismos, unidos operativamente al segmento de ácido nucleico que codifica el agente terapéutico. En algunas opciones, el segmento de ácido nucleico se expresa o se codifica en una o más células fotorreceptoras o células EPR de un ojo de mamífero, un polipéptido, un péptido, una ribozima, un ácido nucleico peptídico, un ARNip, un ARNi, un oligonucleótido antisentido, un polinucleótido antisentido, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, o cualquier combinación de los mismos.

15 Otros aspectos de la divulgación se refieren a un método para transducir una célula fotorreceptora de mamífero o una célula del epitelio pigmentario de la retina, comprendiendo el método administrar a uno o ambos ojos del mamífero la partícula de rAAV de una cualquiera de las opciones anteriores, o como se describe de otro modo en el presente documento. En algunas opciones, el método comprende administrar por vía intravítrea o subretiniana a uno o ambos  
20 ojos del mamífero la partícula de rAAV.

Aún otros aspectos de la divulgación se refieren a un método para proporcionar a un mamífero que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico seleccionado, comprendiendo el método administrar a uno o ambos ojos del mamífero, una cantidad de la partícula de rAAV de una cualquiera de las opciones anteriores, o como se describe en el presente documento; y durante un tiempo eficaz para proporcionar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico seleccionado. En algunas opciones, el método comprende administrar por vía intravítrea o subretiniana a uno o ambos ojos del mamífero, una cantidad de la partícula de rAAV; y durante un tiempo eficaz para proporcionar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico  
25 seleccionado.

30 Otros aspectos de la divulgación se refieren a un método para tratar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad, un trastorno, una disfunción, una lesión, una afección anormal, o un traumatismo en un mamífero, comprendiendo el método, administrar por vía intravítrea o subretiniana a uno o ambos ojos del mamífero que lo necesite, la partícula de rAAV de una cualquiera de las opciones anteriores, o como se describe en el presente documento, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para tratar o mejorar el uno o más síntomas de la enfermedad, el trastorno, la disfunción, la lesión, la afección anormal, o el traumatismo en el mamífero.  
35

Otros aspectos de la divulgación se refieren a un método para expresar un segmento de ácido nucleico en una o más células fotorreceptoras o una o más células EPR de un mamífero, comprendiendo el método: administrar por vía subretiniana o intravítrea a uno o ambos ojos del mamífero la partícula de rAAV de una cualquiera de las opciones anteriores, o como se describe de otro modo en el presente documento, en el que la partícula de rAAV comprende un polinucleótido que comprende al menos un primer polinucleótido que comprende un promotor específico de células PR o EPR unido operativamente al menos a un primer segmento de ácido nucleico que codifica un agente terapéutico, durante un tiempo eficaz para producir el agente terapéutico en una o más células PR o células RPE del mamífero.  
40

45 En algunas opciones, el mamífero es humano. En algunas opciones, el ser humano es un neonato, un recién nacido, un bebé o un joven. En algunas opciones, el ser humano tiene, se sospecha que tiene, está en riesgo de desarrollar, o ha sido diagnosticado con un trastorno de la retina, una enfermedad de la retina, una distrofia de la retina, o cualquier combinación de los mismos. En algunas opciones, el trastorno de la retina, la enfermedad de la retina, o la distrofia de la retina es hereditaria.  
50

En algunas opciones, la producción del agente terapéutico a) conserva una o más células fotorreceptoras o una o más células EPR, b) restaura una o más funciones mediadas por bastones y/o conos, c) restaura el comportamiento visual en uno o ambos ojos, o d) cualquier combinación de los mismos. En algunas opciones, la producción del agente terapéutico persiste en una o más células fotorreceptoras o en una o más células EPR sustancialmente durante un periodo de al menos tres meses después de una administración inicial de la partícula de rAAV en el uno o ambos ojos del mamífero. En algunas opciones, la producción del agente terapéutico persiste en la una o más células retinianas sustancialmente durante un periodo de al menos seis meses después de una administración inicial de la partícula de rAAV en uno o ambos ojos del mamífero.  
55

60 En algunas opciones, el agente terapéutico es un agonista, un antagonista, un factor antiapoptosis, un inhibidor, un receptor, una citocina, una citotoxina, un agente eritropoyético, una glucoproteína, un factor de crecimiento, un receptor del factor de crecimiento, una hormona, un receptor hormonal, un interferón, una interleucina, un receptor de interleucina, un factor de crecimiento nervioso, un péptido neuroactivo, un receptor de péptido neuroactivo, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una proteína descarboxilasa, una proteína cinasa, un inhibidor de proteína cinasa, una enzima, una proteína de unión al receptor, una proteína de transporte o un inhibidor de la misma, un receptor de  
65

serotonina, o un inhibidor de captación de la misma, una serpina, un receptor de serpina, un supresor tumoral, un quimioterapéutico, o cualquier combinación de los mismos.

5 Otros aspectos de la divulgación se refieren a un vector de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside modificada, en la que la proteína de la cápside modificada comprende una o más sustituciones de aminoácidos no nativos (por ejemplo, una o más serinas, treoninas, o glicinas, o una combinación de las mismas) en las posiciones correspondientes a uno o más residuos de aminoácidos expuestos a la superficie de unión a sulfato de heparina (por ejemplo, una o más argininas expuestas a la superficie) de una proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2; o a los residuos de aminoácidos correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10. En algunas opciones, las sustituciones de aminoácidos no nativos se producen en una o más (por ejemplo, una, dos o tres) posiciones correspondientes a una o más de: R585, R588, y R487 (por ejemplo, R585, R588, R487, R585 + R588, R585 + R487, R588 + R487, o R585 + R588 + R487) de una proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o a los residuos de aminoácidos correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.

20 En algunas opciones, la proteína de la cápside modificada comprende además una o más sustituciones de aminoácidos no nativos en las posiciones correspondientes a uno o más residuos de tirosina y/o treonina expuestos a la superficie (por ejemplo, fenilalanina o valina) de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2; o a residuos de tirosina correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10. En algunas opciones, las sustituciones de aminoácidos no nativos se producen en una o más (por ejemplo, una, dos, tres o cuatro) posiciones correspondientes a una o más de: Y444, T491, Y500, e Y730 de una proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o a los residuos de aminoácidos correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.

35 En algunas opciones, las sustituciones de aminoácidos no nativos se producen en los residuos de aminoácidos: (a) Y444, T491, Y500, R585, R588, R487, e Y730; (b) Y444, T491, Y500, R585, e Y730; (c) Y444, T491, Y500, R588, e Y730; (d) Y444, T491, Y500, R585, R588, e Y730; (e) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588, R487, e Y730; (f) Y444, T491, Y500, E530, R585, e Y730; (g) Y444, T491, Y500, E530, R588, e Y730; o (h) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588, e Y730 de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o en las posiciones de aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.

45 En algunas opciones, las sustituciones de aminoácidos no nativos comprenden: (a) Y444F, T491V, Y500F, R585S, R588T, R487G, e Y730F; (b) Y444F, T491V, Y500F, R585S, e Y730F; (c) Y444F, T491V, Y500F, R588T, e Y730F; (d) Y444F, T491V, Y500F, R585S, R588T, e Y730F; (e) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, R588T, R487G, e Y730F; (f) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, e Y730F; (g) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R588T, e Y730F; o (h) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, R588T, e Y730F de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o en las posiciones de aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10. En algunas opciones, la eficiencia de transducción de una partícula que comprende la proteína de la cápside modificada es aproximadamente de 2 a aproximadamente 50 veces mayor en la una o más células fotorreceptoras o EPR que la de una partícula que comprende una proteína de la cápside de tipo silvestre no modificada correspondiente.

55 En algunas opciones, la divulgación proporciona un vector viral recombinante adenoasociado (rAAV) que incluye: un polinucleótido que codifica una proteína de la cápside modificada, en el que la proteína de la cápside modificada comprende al menos un primer aminoácido no nativo en una posición que corresponde a un residuo de aminoácido expuesto a la superficie en la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2, y en el que, además, la eficiencia de transducción de un virión que comprende la proteína de la cápside modificada es mayor que la de un virión que comprende una proteína de la cápside de tipo silvestre no modificada correspondiente, y en el que el polinucleótido comprende además un segmento de ácido nucleico que codifica una molécula de diagnóstico o terapéutica unida operativamente a un promotor que es capaz de expresar el segmento de ácido nucleico en uno o más fotorreceptores o células del epitelio pigmentario de la retina de un ojo de mamífero, en el que la proteína de la cápside modificada comprende tres o más sustituciones de aminoácidos no nativos en las posiciones correspondientes a tres residuos de aminoácidos expuestos a la superficie distintos de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone



en la SEQ ID NO: 2; o a tres residuos de aminoácidos expuestos a la superficie distintos correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10, o cualquier combinación de las mismas.

5 Los ejemplos del vector rAAV divulgado incluyen, sin limitación, aquellos en los que las sustituciones de aminoácidos no nativos se producen en los residuos de aminoácidos: (a) Y444, Y500, e Y730; (b) Y272, Y444, Y500, e Y730; (c) Y444, T491, Y500, R585, R588, R487, e Y730; (d) Y444, T491, Y500, R585, e Y730; (e) Y444, T491, Y500, R588, e Y730; (f) Y444, T491, Y500, R585, R588, e Y730; (g) Y444, T491, Y500, e Y730; (h) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588, R487, e Y730; (i) Y444, T491, Y500, E530, R585, e Y730; (j) Y444, T491, Y500, E530, R588, e Y730; (k) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588, e Y730; o (l) Y444, T491, Y500, E530, e Y730; de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o en las posiciones de aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10, o cualquier combinación de las mismas.

20 En opciones a modo de ejemplo, los vectores rAAV de la divulgación incluyen, pero sin limitación, aquellos en los que las sustituciones de aminoácidos no nativos incluyen: (a) Y444F, Y500F, e Y730F; (b) Y272F, Y444F, Y500F, e Y730F; (c) Y444F, T491V, Y500F, R585S, R588T, R487G, e Y730F; (d) Y444F, T491V, Y500F, R585S, e Y730F; (e) Y444F, T491V, Y500F, R588T, e Y730F; (f) Y444F, T491V, Y500F, R585S, R588T, e Y730F; (g) Y444F, T491V, Y500F, e Y730F; (h) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, R588T, R487G, e Y730F; (i) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, e Y730F; (j) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R588T, e Y730F; (k) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, R588T, e Y730F; o (l) Y444F, T491V, Y500F, E530K, e Y730F; de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o en las posiciones de aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10, o cualquier combinación de las mismas.

30 En algunas opciones, los vectores de divulgación tienen una eficiencia de transducción que es al menos aproximadamente de 2 a aproximadamente 50 veces mayor en una o más células fotorreceptoras, o en una o más células EPR, que la de un virión que comprende una proteína de la cápside de tipo silvestre no modificada correspondiente.

35 En algunas opciones, los vectores rAAV divulgados incluirán un segmento de ácido nucleico que además incluye un potenciador, una secuencia reguladora postranscripcional, una señal de poliadenilación, o cualquier combinación de los mismos, unidos operativamente al segmento de ácido nucleico que codifica la molécula de diagnóstico o terapéutica seleccionada.

40 Las moléculas a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, polipéptidos, péptidos, ribozimas, ácidos peptidonucleicos, ARNip, ARNi, oligonucleótidos antisentido, polinucleótidos antisentido, anticuerpos (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos), así como cualquier combinación de los mismos.

45 En otros aspectos de la divulgación, se divulga en el presente documento un método para proporcionar a un mamífero que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico seleccionado. Tal método generalmente incluye al menos la etapa de administrar a uno o ambos ojos del mamífero, una cantidad de uno o más de los vectores rAAV divulgados en el presente documento; durante un tiempo eficaz para proporcionar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico seleccionado.

50 El método puede incluir, por ejemplo, la etapa de administrar por vía intravítrea o subretiniana (una o varias veces) a uno o ambos ojos del mamífero, una cantidad de uno o más vectores rAAV divulgados en el presente documento; y durante un tiempo eficaz para proporcionar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del agente de diagnóstico o terapéutico seleccionado.

55 En otra opción, la divulgación proporciona un método para tratar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad, un trastorno, una disfunción, una lesión, una afección anormal, o un traumatismo en un mamífero. En un sentido global y general, tal método incluye al menos la etapa de administrar a uno o ambos ojos del mamífero que lo necesite, uno o más de los vectores rAAV divulgados en el presente documento, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para tratar o mejorar el uno o más síntomas de la enfermedad, el trastorno, la disfunción, la lesión, la afección anormal, o el traumatismo en el mamífero.

60 En otra opción, la divulgación proporciona un método para expresar un segmento de ácido nucleico en una o más células fotorreceptoras o una o más células EPR de un mamífero (por ejemplo, un ser humano). En un sentido global y general, tal método incluye administrar (por ejemplo, administrar directamente ya sea por vía subretiniana o intravítrea) a uno o ambos ojos del mamífero uno o más de los vectores rAAV divulgados en el presente documento, en el que el polinucleótido comprende además al menos un primer polinucleótido que comprende un promotor

específico de células PR o EPR unido operativamente al menos a un primer segmento de ácido nucleico que codifica un agente terapéutico, durante un tiempo eficaz para producir el agente terapéutico en una o más células PR o células RPE del mamífero. En algunas opciones, el ser humano es un neonato, un recién nacido, un bebé o un joven.

- 5 En la práctica de la divulgación, se contempla que los pacientes adecuados incluirán, por ejemplo, seres humanos que tienen, se sospecha que tienen, están en riesgo de desarrollar, o han sido diagnosticados con uno o más trastornos, enfermedades o distrofias de la retina, incluyendo, sin limitación, trastornos, enfermedades y distrofias de la retina que están genéticamente vinculadas o son hereditarias.
- 10 En algunas opciones, la producción del agente terapéutico en las células dirigidas a la administración de la construcción terapéutica a) conservará una o más células fotorreceptoras o una o más células EPR, b) restaurará una o más funciones mediadas por bastones y/o conos, c) restaurará el comportamiento visual en uno o ambos ojos, o d) cualquier combinación de los mismos.
- 15 En algunas opciones, la producción del agente terapéutico persiste en una o más células fotorreceptoras o en una o más células EPR sustancialmente durante un periodo de al menos tres meses, al menos seis meses, al menos nueve meses, o al menos un año o más, después de una administración inicial de la construcción de terapia génica de rAAV en uno o ambos ojos del mamífero. En algunas enfermedades, puede ser preferible administrar la construcción del vector rAAV una sola vez, mientras que en el manejo o tratamiento de otras enfermedades o afecciones, puede ser deseable proporcionar dos o más administraciones de las construcciones del vector al paciente en uno o más periodos de administración. En dichas circunstancias, las terapias basadas en vectores AAV pueden proporcionarse sucesivamente en uno o más periodos diarios, semanales, mensuales o menos frecuentes, según sea necesario, para lograr el tratamiento o la mejora de uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno a tratar. En algunas opciones, el vector es un vector rAAV autocomplementario (scAAV), mientras que en otras opciones, el vector puede proporcionarse a uno o ambos ojos mediante una o más administraciones de una partícula viral adenoasociada infecciosa, un virión rAAV, o una pluralidad de partículas infecciosas de rAAV en una cantidad y durante un tiempo suficiente para tratar o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o afección que se está tratando.
- 20
- 25 En ciertas opciones, el agente terapéutico puede ser un agonista, un antagonista, un factor antiapoptosis, un inhibidor, un receptor, una citocina, una citotoxina, un agente eritropoyético, una glucoproteína, un factor de crecimiento, un receptor del factor de crecimiento, una hormona, un receptor hormonal, un interferón, una interleucina, un receptor de interleucina, un factor de crecimiento nervioso, un péptido neuroactivo, un receptor de péptido neuroactivo, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una proteína descarboxilasa, una proteína cinasa, un inhibidor de proteína cinasa, una enzima, una proteína de unión al receptor, una proteína de transporte o un inhibidor de la misma, un receptor de serotonina, o un inhibidor de captación de la misma, una serpina, un receptor de serpina, un supresor tumoral, un quimioterapéutico, o cualquier combinación de los mismos.
- 30
- 35

#### Breve descripción de los dibujos

- 40 Para promover una comprensión de los principios de la divulgación, ahora se hará referencia a las opciones, o ejemplos, ilustrados en los dibujos y se utilizará un lenguaje específico para describirlos. Sin embargo, se entenderá que no se pretende limitar el alcance de la divulgación. Cualquier alteración y modificaciones adicionales en las opciones descritas, y cualquier otra aplicación de los principios de la divulgación, como se describe en el presente documento, se contemplan como normalmente le ocurriría a un experto en la técnica a la que se refiere la divulgación.
- 45

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar ciertos aspectos de la presente divulgación. La divulgación puede entenderse mejor haciendo referencia a la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que los números de referencia similares identifican elementos similares, y en los que:

50

**La FIG. 1A, FIG. 1B, FIG. 1C, y la FIG. 1D** muestran el perfil de transducción de vectores basados en AAV2 que contienen un promotor ubicuo de CBA y un indicador mCherry después de una inyección intravítrea o subretiniana en ojos de ratón de tipo silvestre. Los vectores se administraron a una concentración de  $1 \times 10^{12}$  vg/ml. AAV2MAX $\Delta$ HS, que carece de residuos de unión a HS canónicos, no transduce las neuronas retinianas después de la inyección intravítrea (**FIG. 1A**), mientras que su administración al espacio subretiniano promueve la transducción robusta tanto de fotorreceptores como de EPR (**FIG. 1B**). Este hallazgo respalda la noción de que no se requiere HS para la transducción de fotorreceptores o EPR. De forma interesante, el nivel de transducción visto con este vector está a la par con el observado después de la inyección subretiniana de AAV5 o AAV8. AAV2 (tripleY $\rightarrow$ F+T $\rightarrow$ V), que conserva la unión a HS, exhibe la transducción de las neuronas retinianas después de la administración al espacio subretiniano o al vítreo (**FIG. 1C** y **FIG. 1D**);

55 la **FIG. 2** muestra los resultados de un estudio en el que se infectaron células fotorreceptoras de cono 661W con vectores basados en AAV2 que contenían el promotor ubicuo de CBA y un indicador mCherry con un MOI de 5000. Tres días más tarde, se cuantificó la fluorescencia de mCherry en muestras con clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Debido a que la capacidad de infectar estas células depende de la unión a HS, los mutantes de la cápside con afinidad por HS reducida o ablada demuestran una mala transducción; y

60 la **FIG. 3** ilustra la unión del heparán sulfato (HS) de diversos mutantes de la cápside basados en AAV2 contruidos

65

de acuerdo con ciertos aspectos de la presente divulgación.

**Breve descripción de las secuencias**

- 5 La **SEQ ID NO: 1** es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del serotipo 1 de virus adenoasociados de tipo silvestre (AAV1);
- La **SEQ ID NO: 2** es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del serotipo 2 de virus adenoasociados de tipo silvestre (AAV2);
- 10 La **SEQ ID NO: 3** es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del serotipo 3 de virus adenoasociados de tipo silvestre (AAV3);
- La **SEQ ID NO: 4** es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del serotipo 4 de virus adenoasociados de tipo silvestre (AAV4);
- La **SEQ ID NO: 5** es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del serotipo 5 de virus adenoasociados de tipo silvestre (AAV5);
- 15 La **SEQ ID NO: 6** es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del serotipo 6 de virus adenoasociados de tipo silvestre (AAV6);
- La **SEQ ID NO: 7** es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del serotipo 7 de virus adenoasociados de tipo silvestre (AAV7);
- 20 La **SEQ ID NO: 8** es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del serotipo 8 de virus adenoasociados de tipo silvestre (AAV8);
- La **SEQ ID NO: 9** es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del serotipo 9 de virus adenoasociados de tipo silvestre (AAV9); y
- la **SEQ ID NO: 10** es una secuencia de aminoácidos de la proteína de la cápside del serotipo 10 de virus adenoasociados de tipo silvestre (AAV10).

25 Debe entenderse que las SEQ ID NOs: 1-10 se refieren a proteínas de la cápside de VP1 a modo de ejemplo y que las proteínas de la cápside de VP2 y VP3 son variantes más cortas de la proteína de la cápside de VP1 que generalmente tienen un extremo N-terminal truncado en comparación con VP1. Por ejemplo, VP2 de AAV2 puede carecer de los primeros 137 aminoácidos de VP1, y VP3 de AAV2 puede carecer de los primeros 202 aminoácidos de VP1.

**Descripción de opciones ilustrativas**

35 Las opciones ilustrativas de la divulgación se describen a continuación. La capacidad única de los vectores divulgados para dirigir selectiva y exclusivamente las células PR o EPR facilita múltiples usos *in vivo*. Primero, facilita el desarrollo de estrategias de reemplazo génico para enfermedades retinianas hereditarias asociadas con mutaciones en genes específicos de PR y/o EPR que incluyen, por ejemplo, genes responsables de una o más enfermedades retinianas hereditarias.

40 En una opción particular, la divulgación proporciona vectores rAAV mejorados que se han derivado de varios serotipos diferentes, incluyendo, por ejemplo, los seleccionados del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, y AAV10, cuyas secuencias de proteínas de la cápside a modo de ejemplo se exponen en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, y SEQ ID NO: 10, en el presente documento, respectivamente.

45 Las partículas de rAAV modificadas con la proteína de la cápside de VP3 multimitada de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, las que comprenden tres, cuatro, cinco, seis, o siete o más sustituciones de aminoácidos no nativos en tres, cuatro, cinco, seis o siete o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: (a) Tyr444, Arg487, Thr491, Tyr500, Glu530, Arg585, Arg588, y Tyr730 de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2; y (b) tres, cuatro, cinco, seis, o siete o más sustituciones de aminoácidos no nativos en tres, cuatro, cinco, seis o siete o más posiciones de aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas, en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10, o cualquier combinación de las mismas.

55 La divulgación también proporciona un polinucleótido aislado y purificado que codifica uno o más de los vectores rAAV o proteínas de la cápside divulgadas en el presente documento, así como una pluralidad de viriones virales adenoasociados infecciosos que contienen tal polinucleótido. En algunas opciones, las construcciones vectoriales de la presente divulgación incluyen, o incluyen además, al menos un segmento de ácido nucleico que codifica al menos un agente terapéutico ocular unido operativamente a un promotor específico de fotorreceptores o EPR que es capaz de expresar el segmento de ácido nucleico en células de retina de mamífero adecuadas que se han transformado con la construcción del vector.

60 En algunas opciones, la eficiencia de transducción de una partícula que comprende una proteína de la cápside multimitada será mayor que la de la proteína de tipo silvestre correspondiente, no modificada, y como tal, poseerá una eficiencia de transducción en las células de la retina de mamífero que está al menos 2 veces, al menos

aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 10 veces, o al menos aproximadamente 12 veces o más en una célula huésped de mamífero seleccionada que la de un virión que comprende una proteína de la cápside no modificada correspondiente. En ciertas opciones, la eficiencia de transducción de las partículas de rAAV proporcionadas en el presente documento será al menos aproximadamente 15 veces mayor, al menos aproximadamente 20 veces mayor, al menos aproximadamente 25 veces mayor, al menos aproximadamente 30 veces mayor o al menos aproximadamente 40, 45 o 50 veces o más mayor que la de un virión que comprende una proteína de la cápside no modificada correspondiente. En algunas opciones, los viriones infecciosos de la presente divulgación que incluyen una o más proteínas de la cápside de AAV modificada son menos susceptibles de ubiquitinación cuando se introducen en una célula de mamífero que la de un virión que comprende una proteína de cápside no modificada correspondiente.

La presente divulgación también se refiere a vectores de polinucleótidos de rAAV, en los que el segmento de ácido nucleico comprende además un promotor, un potenciador, una secuencia reguladora postranscripcional, una señal de poliadenilación, o cualquier combinación de los mismos, unidos operativamente al segmento de ácido nucleico que codifica el polinucleótido de interés seleccionado.

En algunas opciones, el promotor es un promotor heterólogo, y en particular, un promotor específico de células PR o EPR de mamífero.

En ciertas opciones, los segmentos de ácido nucleico clonados en los nuevos vectores de expresión de rAAV descritos en el presente documento expresarán o codificarán uno o más polipéptidos, péptidos, ribozimas, ácidos peptidonucleicos, ARNip, ARNi, oligonucleótidos antisentido, polinucleótidos antisentido, anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, o cualquier combinación de los mismos, cuando se introducen en células huésped de mamífero adecuadas, tales como células PR y/o EPR del ojo humano.

Como se observa en el presente documento, los agentes terapéuticos útiles en la divulgación pueden incluir uno o más agonistas, antagonistas, factores antiapoptosis, inhibidores, receptores, citocinas, citotoxinas, agentes eritropoyéticos, glucoproteínas, factores de crecimiento, receptores del factor de crecimiento, hormonas, receptores hormonales, interferones, interleucinas, receptores de interleucina, factores de crecimiento nervioso, péptidos neuroactivos, receptores de péptidos neuroactivos, proteasas, inhibidores de proteasa, proteínas descarboxilasas, proteínas cinasas, inhibidores de proteína cinasa, enzimas, proteínas de unión al receptor, proteínas de transporte o uno o más inhibidores de las mismas, receptores de serotonina, o uno o más inhibidores de la captación de la misma, serpinas, receptores de serpina, supresores tumorales, moléculas de diagnóstico, agentes quimioterapéuticos, citotoxinas, o cualquier combinación de los mismos.

Los vectores de polinucleótido o ácido nucleico de rAAV de la presente divulgación pueden estar comprendidos dentro de un virión que tiene un serotipo que se selecciona del grupo que consiste en el serotipo 1 de AAV, serotipo 2 de AAV, serotipo 3 de AAV, serotipo 4 de AAV, serotipo 5 de AAV, serotipo 6 de AAV, serotipo 7 de AAV, serotipo 8 de AAV, serotipo 9 de AAV, o serotipo 10 de AAV, o cualquier otro serotipo conocido por un experto en las técnicas virales.

En opciones relacionadas, la divulgación proporciona además poblaciones y pluralidades de vectores de polinucleótidos o ácido nucleico de rAAV, viriones, partículas virales infecciosas, o células huésped que comprenden una proteína de cápside multimutada y uno o más segmentos de ácido nucleico que incluyen un promotor específico de células EPR o PR unido operativamente a un polinucleótido seleccionado que codifica al menos un primer diagnóstico y/o una primera molécula terapéutica.

La divulgación proporciona además composición y formulaciones que incluyen una o más de las proteínas, segmentos de ácido nucleico, vectores de polinucleótidos o de ácido nucleico virales, células huésped, o partículas virales de la presente divulgación junto con uno o más tampones, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Dichas composiciones pueden incluirse en uno o más kits de diagnóstico o terapéuticos, para diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad, lesión, trastorno, traumatismo o disfunción de mamífero, y en particular, para la administración de un agente terapéutico a fotorreceptores y/o células EPR del ojo de mamífero.

La divulgación incluye además un método para proporcionar a un mamífero que lo necesite una cantidad diagnóstica o terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico seleccionado, comprendiendo el método proporcionar a una célula, tejido u órgano de un mamífero que lo necesite, una cantidad de una o más de las partículas mutantes de múltiples cápsides de rAAV o vectores de ácido nucleico divulgados; y durante un tiempo eficaz para proporcionar al mamífero una cantidad diagnóstica o terapéuticamente eficaz del agente terapéutico seleccionado.

La divulgación proporciona además un método para diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar al menos uno o más síntomas de una enfermedad, un trastorno, una disfunción, una lesión, una afección anormal, o un traumatismo en un mamífero. En un sentido global y general, el método incluye al menos la etapa de administrar a un mamífero que lo necesite una o más de las partículas de rAAV o vectores de ácido nucleico divulgados, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar el uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno, disfunción, lesión, afección anormal o traumatismo en el mamífero.

La divulgación también proporciona un método para transducir una población de células de mamífero, y una o más células oculares particulares en el ojo humano. En un sentido global y general, el método incluye al menos la etapa de introducir en una o más células de la población, una composición que comprende una cantidad eficaz de una o más de las partículas de rAAV o vectores de ácido nucleico divulgados en el presente documento. En ciertas opciones, la administración de las construcciones de terapia génica divulgadas a una o más células por vía subretiniana, permitió la transducción de alta eficiencia de fotorreceptores y células EPR.

En una opción adicional, la divulgación también proporciona segmentos de ácido nucleico aislados que codifican una o más de las proteínas de la cápside mutante de AAV como se describe en el presente documento, y proporciona vectores de ácido nucleico recombinantes que comprenden dichos segmentos.

Adicionalmente, la presente divulgación proporciona composiciones, así como kits terapéuticos y/o de diagnóstico que incluyen una o más de las composiciones de partículas de AAV o vector de ácido nucleico divulgadas, formuladas con uno o más ingredientes adicionales, o preparadas con una o más instrucciones para su uso.

La divulgación también demuestra métodos para la fabricación, así como métodos para usar las partículas mutadas de la cápside de rAAV o vectores de ácido nucleico mejorados descritos en diversas formas, incluyendo, por ejemplo, *ex situ*, aplicaciones *in vitro* e *in vivo*, metodologías, procedimientos de diagnóstico y/o métodos de terapia génica. Debido a que muchos de los vectores mejorados son resistentes a la degradación proteasómica, poseen eficiencias de transducción significativamente aumentadas *in vivo*, lo que los hace particularmente adecuados para regímenes de terapia génica humana basados en vectores virales, y para administrar una o más construcciones genéticas a células de mamífero seleccionadas *in vivo* y/o *in vitro*.

En un aspecto, la divulgación proporciona composiciones que comprenden vectores virales adenoasociados (AAV) recombinantes, viriones, partículas virales y formulaciones farmacéuticas de los mismos, útiles en métodos para administrar material genético que codifica uno o más productos beneficiosos o terapéuticos a células y tejidos de mamífero. En particular, las composiciones y métodos de la divulgación proporcionan un avance significativo en la técnica a través de su uso en el tratamiento, prevención y/o mejora de los síntomas de una o más enfermedades de mamífero. Se contempla que la terapia génica humana se beneficiará particularmente de las presentes enseñanzas al proporcionar construcciones de vectores virales nuevas y mejoradas para su uso en el tratamiento de una serie de diversas enfermedades, trastornos y disfunciones.

En otro aspecto, la divulgación se refiere al vector rAAV modificado que codifica uno o más agentes terapéuticos de mamífero para la prevención, tratamiento y/o mejora de uno o más trastornos en el mamífero en el que se administra la construcción del vector.

En particular, la divulgación proporciona construcciones de expresión basadas en rAAV que codifican uno o más agentes terapéuticos de mamíferos (incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, proteína(s), polipéptido(s), péptido(s), enzima(s), anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, así como variantes, y/o fragmentos activos de los mismos, para su uso en el tratamiento, profilaxis y/o mejora de uno o más síntomas de una enfermedad, disfunción, lesión y/o trastorno de mamífero.

En algunas opciones, la divulgación proporciona una partícula de rAAV que comprende al menos una primera proteína de la cápside que comprende al menos una primera sustitución de aminoácidos por un aminoácido no nativo en uno o más residuos de aminoácidos expuestos a la superficie en una proteína de la cápside de rAAV, y en la que la partícula además incluye un vector que comprende al menos un primer segmento de ácido nucleico que codifica al menos un primer agente de diagnóstico o terapéutico unido operativamente a un promotor específico de células EPR o PR capaz de expresar el segmento en una o más células que se han transformado con el vector. Los promotores específicos de células PR a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, promotores de rodopsina cinasa humana (hGRK1), IRBP, opsina de bastón, NRL, GNAT2e-IRBP, opsina L/M y arrestina de cono. Los promotores de células específicas de EPR a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, promotores VMD2 (Best1) y EPR65.

Las partículas de rAAV modificadas con aminoácidos expuestas a la superficie o vectores de ácido nucleico de la presente divulgación pueden incluir adicionalmente una o más secuencias potenciadoras que están unidas operativamente al segmento de ácido nucleico que codifica la molécula de diagnóstico o terapéutica de interés. Las secuencias potenciadoras a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, uno o más seleccionados del grupo que consiste en un potenciador de CMV, un potenciador sintético, un potenciador específico de fotorreceptores, un potenciador específico de células del epitelio pigmentario de la retina, un potenciador específico vascular, un potenciador específico ocular, un potenciador específico de células neurales, un potenciador específico de células retinianas, y similares, y cualquier combinación de los mismos.

Los promotores a modo de ejemplo útiles en la práctica de la divulgación incluyen, sin limitación, uno o más promotores específicos de tejido, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitación, promotores específicos de fotorreceptores y/o específicos de células EPR y similares.

El primer segmento de ácido nucleico también puede incluir una o más secuencias reguladoras postranscripcionales o una o más señales de poliadenilación, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitación, un elemento regulador postranscripción del virus de la hepatitis de marmota (WEPR), una secuencia de señal de poliadenilación, o un intrón/uniones de exón/señales de corte y empalme, o cualquier combinación de los mismos.

5 Los agentes terapéuticos o de diagnóstico a modo de ejemplo que pueden administrarse a las células huésped mediante las presentes construcciones de vectores incluyen, pero sin limitación, un agente seleccionado del grupo que consiste en un polipéptido, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, una ribozima, un ácido nucleico peptídico, un ARNip, un ARNi, un oligonucleótido antisentido, un polinucleótido antisentido, y cualquier combinación de los mismos.

15 En opciones a modo de ejemplo, los vectores rAAV mejorados de la divulgación codificarán al menos una proteína o polipéptido de diagnóstico o terapéutico seleccionado del grupo que consiste en un marcador molecular, opsinas fotosensibles, incluyendo, sin limitación, rodopsina, melanopsina, opsinas de cono, rodopsinas de canal, opsinas bacterianas o asociadas a arqueas, un agonista adrenérgico, un factor antiapoptosis, un inhibidor de la apoptosis, un receptor de citocina, una citocina, una citotoxina, un agente eritropoyético, una descarboxilasa de ácido glutámico, una glucoproteína, un factor de crecimiento, un receptor del factor de crecimiento, una hormona, un receptor hormonal, un interferón, una interleucina, un receptor de interleucina, una cinasa, un inhibidor de cinasa, un factor de crecimiento nervioso, una netrina, un péptido neuroactivo, un receptor de péptido neuroactivo, un factor neurogénico, un receptor del factor neurogénico, una neuropilina, un factor neurotrófico, una neurotrofina, un receptor de neurotrofina, un antagonista de N-metil-D-aspartato, una plexina, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una proteína descarboxilasa, una proteína cinasa, un inhibidor de proteína cinasa, una proteína proteolítica, un inhibidor de la proteína proteolítica, una semaforina, un receptor de semaforina, una proteína transportadora de serotonina, un inhibidor de la captación de serotonina, un receptor de serotonina, una serpina, un receptor de serpina, un supresor tumoral, y cualquier combinación de los mismos.

20 En algunas opciones, los vectores rAAV modificados con cápside de la presente divulgación pueden incluir uno o más segmentos de ácido nucleico que codifican un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en EPR65, Bestrofina (BEST1), REP1, MERTK, SOD2, MYO7A, MFRP, LRAT, KCNJ13, ornitina aminotransferasa (OAT), y cualquier combinación o fragmento peptídico de los mismos.

30 En algunas opciones, los vectores rAAV modificados con cápside de la presente divulgación pueden incluir uno o más segmentos de ácido nucleico que codifican un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en CNTF, GDNF, BDNF, IL6, LIF, XIAP, STAT3, y cualquier combinación o fragmento peptídico de los mismos.

35 En determinadas aplicaciones, los vectores rAAV modificados con cápside de la presente divulgación pueden incluir uno o más segmentos de ácido nucleico que codifican un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en nictalopina (nyx), receptor metabotrópico de glutamato 6-mGluR6 (*Grm6*), potencial receptor transitorio melastatina 1 (*TRPM1*), receptor 179 acoplado a proteína G (*GPR179*) y proteínas G, *Gβ5*, *Gβ3*, *Gα01/2*, *Gγ13*, *RGS7*, *RGS11*, *R9AP*, y cualquier combinación o fragmento peptídico de los mismos.

40 En otra opción, la divulgación se refiere a vectores de ácido nucleico de rAAV con eficiencia de transducción mejorada genéticamente modificados que incluyen al menos un primer segmento de ácido nucleico que codifica uno o más agentes de diagnóstico o terapéuticos que alteran, inhiben, reducen, previenen, eliminan, o deterioran la actividad de uno o más procesos biológicos endógenos en una célula de mamífero adecuadamente transformada con el vector de interés. En ciertas opciones, dichos agentes de diagnóstico o terapéuticos pueden incluir una molécula que inhibe o reduce selectivamente los efectos de uno o más procesos metabólicos, disfunciones, trastornos o enfermedades. En ciertas opciones, el defecto puede ser causado por una lesión o traumatismo en el mamífero para el que se desea el tratamiento. En otras opciones, el defecto puede ser causado por la sobreexpresión de un compuesto biológico endógeno, mientras que en aún otras opciones; el defecto puede ser causado por la baja expresión o incluso la falta de uno o más compuestos biológicos endógenos.

45 Los vectores de ácido nucleico de rAAV genéticamente modificados y los sistemas de expresión de la presente divulgación también pueden incluir además un segundo segmento de ácido nucleico que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, uno o más potenciadores, uno o más elementos reguladores, uno o más elementos transcripcionales, o cualquier combinación de los mismos, que alteran, mejoran, regulan y/o afectan a la transcripción de la secuencia de nucleótidos de interés expresada por los vectores rAAV modificados.

50 Por ejemplo, los vectores de ácido nucleico de rAAV de la presente divulgación pueden incluir además un segundo segmento de ácido nucleico que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, un potenciador de CMV, un potenciador sintético, un potenciador específico de células, un tejido potenciador específico, o cualquier combinación de los mismos. El segundo segmento de ácido nucleico también puede comprender además, consistir esencialmente en, o consistir en, una o más secuencias de intrones, uno o más elementos reguladores postranscripcionales, o uno o más potenciadores de rodopsina, melanopsina, opsinas de cono, rodopsinas de canal, opsinas bacterianas o asociadas a arqueas, un agonista adrenérgico, un factor antiapoptosis, un inhibidor de la apoptosis, un receptor de citocina, una citocina, una citotoxina, un agente eritropoyético, una descarboxilasa de ácido glutámico, una

glucoproteína, un factor de crecimiento, un receptor del factor de crecimiento, una hormona, un receptor hormonal, un interferón, una interleucina, un receptor de interleucina, una cinasa, un inhibidor de cinasa, un factor de crecimiento nervioso, una netrina, un péptido neuroactivo, un receptor de péptido neuroactivo, un factor neurogénico, un receptor del factor neurogénico, una neuropilina, un factor neurotrófico, una neurotrofina, un receptor de neurotrofina, un antagonista de N-metil-D-aspartato, una plexina, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una proteína descarboxilasa, una proteína cinasa, un inhibidor de proteína cinasa, una proteína proteolítica, un inhibidor de la proteína proteolítica, una semaforina, un receptor de semaforina, una proteína transportadora de serotonina, un inhibidor de la captación de serotonina, un receptor de serotonina, una serpina, un receptor de serpina, o un supresor tumoral. El segundo segmento de ácido nucleico también puede comprender además, consistir esencialmente en, o consistir en, una o más secuencias de intrones, uno o más elementos reguladores postranscripcionales, o uno o más potenciadores de RPE65, Bestrofina (BEST1), REP1, MERTK, SOD2, MYO7A, MFRP, LRAT, KCNJ13, u ornitina aminotransferasa (OAT). El segundo segmento de ácido nucleico también puede comprender además, consistir esencialmente en, o consistir en, una o más secuencias de intrones, uno o más elementos reguladores postranscripcionales, o uno o más potenciadores de RPE65, Bestrofina (BEST1), REP1, MERTK, SOD2, MYO7A, MFRP, LRAT, KCNJ13, ornitina aminotransferasa (OAT), CNTF, GDNF, BDNF, IL6, LIF, XIAP, o STAT3.

Los vectores y sistemas de expresión mejorados de la presente divulgación también pueden incluir opcionalmente un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en, uno o más polienlazadores, sitios de restricción, y/o una o más regiones de clonación múltiple para facilitar inserción (clonación) de uno o más elementos genéticos seleccionados, genes de interés, y/o una o más moléculas terapéuticas o de diagnóstico en el vector rAAV en un sitio seleccionado dentro del vector.

En aspectos adicionales de la presente divulgación, el uno o más polinucleótidos exógenos que pueden administrarse a las células huésped adecuadas por las partículas mejoradas de rAAV modificadas en la cápside que comprenden los vectores de ácido nucleico divulgados en el presente documento son de origen mamífero, con polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos o péptidos de origen, por ejemplo, humano, primate no humano, porcino, bovino, ovino, felino, canino, equino, epino, caprino o lupino.

El polinucleótido o polinucleótidos exógenos que pueden administrarse a las células huésped por las partículas modificadas en la cápside o los vectores virales que se divulgan, en ciertas opciones, pueden codificar una o más proteínas, uno o más polipéptidos, uno o más péptidos, una o más enzimas, o uno o más anticuerpos (o fragmentos de unión a antígeno de los mismos), o como alternativa, pueden expresar uno o más ARNip, ribozimas, oligonucleótidos antisentido, moléculas de PNA, o cualquier combinación de los mismos. Cuando se desean terapias genéticas combinacionales, pueden producirse dos o más moléculas diferentes a partir de un único sistema de expresión de rAAV, o como alternativa, una célula huésped seleccionada puede transfectarse con dos o más sistemas de expresión únicos de rAAV, cada uno de los cuales puede comprender uno o más polinucleótidos distintos que codifican un agente terapéutico.

En otras realizaciones, la divulgación también proporciona vectores nucleicos de rAAV que están comprendidos dentro de una partícula viral adenoasociada infecciosa o un virión, así como una pluralidad de dichos viriones o partículas infecciosas. Dichos vectores y viriones pueden estar comprendidos dentro de uno o más diluyentes, tampones, soluciones fisiológicas o vehículos farmacéuticos, o formulados para la administración a un mamífero en uno o más regímenes de diagnóstico, terapéuticos y/o profilácticos. Los vectores, partículas virales, viriones, y una pluralidad de los mismos de la presente divulgación también se pueden proporcionar en formulaciones de excipientes que son aceptables para la administración veterinaria al ganado seleccionado, animales exóticos, animales domésticos y animales de compañía (incluidas mascotas y similares), así como a primates no humanos, especímenes zoológicos o cautivos de otro tipo.

La divulgación también se refiere a células huésped que comprenden al menos una de las partículas modificadas con proteína de la cápside o vectores de expresión de rAAV divulgados. Dichas células huésped son particularmente células huésped de mamífero, tales como células de retina humana, y pueden aislarse, en cultivo de células o tejidos. En el caso de modelos animales genéticamente modificados, las células huésped transformadas pueden incluso estar comprendidas dentro del cuerpo del propio animal no humano.

En ciertas opciones, la creación de células huésped recombinantes no humanas y/o células huésped humanas recombinantes aisladas que comprenden uno o más de los vectores de ácido nucleico de rAAV divulgados también se considera útil para diversos protocolos de diagnóstico, y de laboratorio, incluyendo, por ejemplo, medios para la producción de cantidades a gran escala de los vectores rAAV descritos en el presente documento. Dichos métodos de producción de virus se contemplan particularmente como una mejora sobre las metodologías existentes, incluyendo en particular, aquellas que requieren títulos muy altos de las reservas virales para ser útiles como una herramienta de terapia génica. Los inventores contemplan que una ventaja muy significativa de los presentes será la capacidad de utilizar títulos más bajos de partículas virales en los protocolos de transducción de mamífero, y aún así mantener las tasas de transfección a un nivel adecuado.

Las composiciones que comprenden uno o más de los vectores rAAV de eficacia de transducción mejorada modificados en la cápside, sistemas de expresión, partículas de AAV infecciosas, o células huésped divulgadas

también forman parte de la presente divulgación, y particularmente aquellas composiciones que comprenden además al menos un primer excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en terapia, y para su uso en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de una o más enfermedades, trastornos, disfunciones o traumatismos de mamífero. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender opcionalmente además uno o más diluyentes, tampones, liposomas, un lípido, un complejo lipídico. Como alternativa, los vectores rAAV sustituidos con aminoácidos expuestos a la superficie de la presente divulgación pueden estar comprendidos dentro de una pluralidad de microesferas, nanopartículas, liposomas o cualquier combinación de los mismos. Se contemplan formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración intravítrea o subretiniana a uno o ambos ojos de un ser humano u otro mamífero, sin embargo, sin embargo, las composiciones divulgadas en el presente documento también pueden encontrar utilidad en la administración a áreas discretas del cuerpo de los mamíferos, incluyendo, por ejemplo, formulaciones que son adecuadas para inyección directa en uno o más órganos, tejidos o tipos de células en el cuerpo.

Otros aspectos de la divulgación se refieren a partículas de virión de virus adenoasociado recombinante (por ejemplo, partículas modificadas con cápside, de eficiencia de transducción mejorada), composiciones y células huésped que comprenden, consistir esencialmente en, o consistir en, uno o más de los vectores rAAV divulgados en el presente documento, tal como, por ejemplo, formulaciones farmacéuticas de los vectores destinados a la administración intravítrea o subretiniana a un ojo de mamífero.

Kits que comprenden una o más de las partículas de rAAV modificadas en la cápside o vectores de ácido nucleico divulgados (así como uno o más viriones, partículas virales, células huésped transformadas o composiciones farmacéuticas que comprenden dichos vectores); y la presente divulgación también proporciona instrucciones para usar dichos kits en una o más opciones clínicas terapéuticas, de diagnóstico y/o profilácticas. Dichos kits pueden comprender además uno o más reactivos, enzimas de restricción, péptidos, agentes terapéuticos, compuestos farmacéuticos, o medios para administrar la composición o composiciones a las células huésped, o a un animal (por ejemplo, jeringas, inyectables y similares). Los kits a modo de ejemplo incluyen aquellos para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de una enfermedad, deficiencia, disfunción y/o lesión, o pueden incluir componentes para la producción a gran escala de los propios vectores virales, tal como para la venta comercial o para su uso por otros, incluyendo, por ejemplo, virólogos, profesionales médicos y similares.

Otro aspecto importante de la presente divulgación se refiere a métodos de uso de las partículas o vectores de rAAV, viriones, sistemas de expresión, composiciones y células huésped descritas en el presente documento en la preparación de medicamentos para diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar al menos uno o más síntomas de una enfermedad, una disfunción, un trastorno, una afección anormal, una deficiencia, lesión, o traumatismo en un animal y, en particular, en el ojo de un mamífero vertebrado. Dichos métodos generalmente implican la administración directa al vítreo de uno o ambos ojos de un mamífero que lo necesite, uno o más de los vectores, viriones, partículas virales, células huésped, composiciones o pluralidades de los mismos divulgados, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para diagnosticar, prevenir, tratar o disminuir uno o más síntomas de dicha enfermedad, disfunción, trastorno, afección anormal, deficiencia, lesión o traumatismo en uno o ambos ojos del animal afectado. Los métodos también pueden abarcar el tratamiento profiláctico de animales que se sospecha que tienen dichas afecciones, o la administración de dichas composiciones a aquellos animales en riesgo de desarrollar dichas afecciones, ya sea después del diagnóstico, o antes del inicio de los síntomas.

Como se ha descrito anteriormente, en algunas opciones, el polinucleótido exógeno codificará una o más proteínas terapéuticas, polipéptidos, péptidos, ribozimas, u oligonucleótidos antisentido, o una combinación de estos. De hecho, el polinucleótido exógeno puede codificar dos o más de dichas moléculas, o una pluralidad de tales moléculas como se desee. Cuando se desean terapias genéticas combinatorias, pueden producirse dos o más moléculas diferentes a partir de un único sistema de expresión de rAAV, o como alternativa, una célula huésped seleccionada puede transfectarse con dos o más sistemas de expresión únicos de rAAV, cada uno de los cuales proporcionará polinucleótidos heterólogos únicos que codifican al menos dos moléculas diferentes de este tipo.

Las composiciones que comprenden uno o más de los vectores de rAAV divulgados, sistemas de expresión, partículas de AAV infecciosas, células huésped, también forman parte de la presente divulgación, y particularmente aquellas composiciones que comprenden además al menos un primer excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en la fabricación de medicamentos y métodos que implican la administración terapéutica de dichas partículas de rAAV o vectores de ácido nucleico. En algunas opciones, las formulaciones farmacéuticas son adecuadas para la administración intravítrea o subretiniana en uno o ambos ojos de un ser humano u otro mamífero.

Otro aspecto importante de la presente divulgación se refiere a métodos de uso de las partículas divulgadas, vectores, viriones, sistemas de expresión, composiciones y células huésped descritas en el presente documento en un método para tratar o mejorar los síntomas o en la preparación de medicamentos para tratar o mejorar la síntomas de diversas deficiencias en un ojo de un mamífero, y en particular una o más deficiencias en fotorreceptores humanos o células EPR. Las enfermedades y trastornos oculares a modo de ejemplo (por ejemplo, causados por una o más deficiencias genéticas en una célula PR o PRE) para el tratamiento o mejora de los síntomas incluyen retinitis pigmentosa, amaurosis congénita de Leber, degeneración macular relacionada con la edad, enfermedad de Best, enfermedad de Stargardt, síndrome de Usher, atrofia geográfica, retinopatía diabética, retinosquiasis, acromatopsia, coroideremia, síndrome de Bardet Biedl, y enfermedades por almacenamiento de glucógeno (manifestación ocular). Dichos métodos



generalmente implican la administración intravítrea o subretiniana a uno o ambos ojos de un sujeto que lo necesite, uno o más de los vectores de partículas, viriones, células huésped, o composiciones divulgadas, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para tratar o mejorar los síntomas de tal deficiencia en el mamífero afectado. Los métodos también pueden abarcar el tratamiento profiláctico de animales que se sospecha que tienen dichas afecciones, o la administración de dichas composiciones a aquellos animales en riesgo de desarrollar dichas afecciones, ya sea después del diagnóstico, o antes del inicio de los síntomas.

## VECTORES RAAV

- 10 Los vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) se han usado con éxito para la transferencia de genes *in vivo* en numerosos modelos animales preclínicos de enfermedad humana, y se han usado con éxito para la expresión a largo plazo de una amplia diversidad de genes terapéuticos (Daya y Berns, 2008; Niemeyer *et al.*, 2009; Owen *et al.*, 2002; Keen-Rhinehart *et al.*, 2005; Scallan *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2004). Los vectores AAV también han generado un beneficio clínico a largo plazo en seres humanos cuando se dirigen a sitios con privilegios inmunes, es decir, administración ocular para la amaurosis congénita de Leber (Bainbridge *et al.*, 2008; Maguire *et al.*, 2008; Cideciyan *et al.*, 2008). Una ventaja importante de este vector es su perfil inmune comparativamente bajo, que provocaba respuestas inflamatorias limitadas y, en algunos casos, incluso dirigía la tolerancia inmune a los productos transgénicos (LoDuca *et al.*, 2009). No obstante, la eficacia terapéutica, cuando se dirige a órganos con privilegios no inmunes, se ha limitado en seres humanos debido a las respuestas de anticuerpos y linfocitos T CD8+ contra la cápside viral, mientras que en modelos animales, también se han informado respuestas adaptativas al producto transgénico (Manno *et al.*, 2006; Mingozzi *et al.*, 2007; Muruve *et al.*, 2008; Vandenberghe y Wilson, 2007; Mingozzi y High, 2007). Estos resultados sugieren que las respuestas inmunes siguen siendo una preocupación para la transferencia génica mediada por vectores AAV.
- 25 El virus adenoasociado (AAV) se considera el vector óptimo para la terapia génica ocular debido a su eficacia, persistencia y baja inmunogenicidad (Daya y Berns, 2008). La identificación de vectores capaces de transducir RP a través del vítreo se ha basado históricamente en identificar qué serotipos tienen tropismo nativo para este tipo de células después de la administración local. Se han usado varios serotipos para dirigir con éxito el transgén a los RP después de la inyección subretiniana (incluyendo, por ejemplo, AAV2, AAV5 y AAV8) demostrando los tres eficacia en experimentos realizados en múltiples especies de mamífero (por ejemplo, ratón, rata, perro, cerdo y primates no humanos) (Ali *et al.*, 1996; Auricchio *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2002; Acland *et al.*, 2001; Vandenberghe *et al.*, 2011; Bennett *et al.*, 1999; Allocca *et al.*, 2007; Petersen-Jones *et al.*, 2009; Lotery *et al.*, 2003; Boye *et al.*, 2012; Stieger *et al.*, 2008; Mussolino *et al.*, 2011; Vandenberghe *et al.*, 2011).
- 35 Los estudios que comparan su eficiencia relativa después de la administración subretiniana en el roedor muestran que tanto AAV5 como AAV8 transducen RP más eficientemente que AAV2, siendo AAV8 el más eficiente (Yang *et al.*, 2002; Allocca *et al.*, 2007; Rabinowitz *et al.*, 2002; Boye *et al.*, 2011; Pang *et al.*, 2011). Previamente se demostró que los vectores AAV2 y AAV8 que contienen mutaciones puntuales de residuos de tirosina expuestos a la superficie (tirosina a fenilalanina, YF) muestran una mayor expresión transgénica en diversos tipos de células retinianas en relación con los vectores no modificados después de la inyección subretiniana e intravítrea (Petr-Silva *et al.*, 2009; Petr-Silva *et al.*, 2011). De los vectores inicialmente probados por esos autores, un mutante triple AAV2 (designado "triple Y → F") exhibió la mayor eficiencia de transducción después de la inyección intravítrea, mientras que un mutante cuádruple AAV2 ("quad Y→F") exhibió la nueva propiedad de potenciado transducción de la retina externa (Petr-Silva *et al.*, 2011).
- 45 Se han logrado mejoras adicionales en la eficiencia de la transducción a través de mutagénesis dirigida de residuos de treonina (T) o serina (S) expuestos a la superficie a aminoácidos no nativos en uno o más de esos aminoácidos. Se ha demostrado que tanto las mutaciones Y → F como T → V/T → A aumentan la eficiencia al disminuir la fosforilación de la cápside y la posterior ubiquitinación como parte de la vía de degradación proteosómica (Zhong *et al.*, 2008; Aslanidi *et al.*, en prensa; Gabriel *et al.*, 2013). Se ha encontrado que el perfil de transducción del AAV administrado por vía intravítrea depende en gran medida del propio procedimiento de inyección. Debido al pequeño tamaño del ojo del ratón, no es raro que las inyecciones transesclerales intravítreas provoquen daños en la retina que podrían permitir la administración de algún vector directamente al espacio subretiniano.
- 55 En algunas opciones, un vector de ácido nucleico de rAAV descrito en el presente documento comprende secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR), tales como las derivadas de un genoma de AAV de tipo silvestre, tal como el genoma de AAV2. En algunas opciones, el vector de ácido nucleico de rAAV comprende además un transgén (también denominado molécula de ácido nucleico heterólogo) unido operativamente a un promotor y, opcionalmente, otros elementos reguladores, en los que las ITR flanquean el transgén. En algunas opciones, el promotor es un promotor específico de células PR o EPR. En algunas opciones, el transgén codifica un agente terapéutico o agente de diagnóstico de interés. En algunas opciones, el vector de ácido nucleico de rAAV está encapsidado por una partícula de rAAV como se describe en el presente documento, por ejemplo, que comprende una proteína de la cápside modificada. Las proteínas de la cápside modificadas a modo de ejemplo (por ejemplo, proteínas de la cápside de AAV2 modificadas) de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, las que comprenden tres, cuatro, cinco, seis, o siete o más sustituciones de aminoácidos no nativos en tres, cuatro, cinco, seis o siete o más residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en: (a) Tyr444, Arg487, Thr491, Tyr500, Glu530, Arg585, Arg588,

y Tyr730 de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2; y (b) tres, cuatro, cinco, seis, o siete o más sustituciones de aminoácidos no nativos en tres, cuatro, cinco, seis o siete o más posiciones de aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas, en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10, o cualquier combinación de las mismas. Las sustituciones de aminoácidos no nativos pueden ser cualquier residuo de aminoácido distinto del residuo nativo. En algunas opciones, la sustitución de aminoácidos no nativos es una sustitución de aminoácidos no conservativa. En algunas opciones, la sustitución de aminoácidos no nativos es una alanina o glicina. En algunas opciones, la sustitución de aminoácidos no nativos es una fenilalanina, valina, serina, treonina o glicina. En algunas opciones, la proteína de la cápside modificada (por ejemplo, la proteína de la cápside de AAV2 modificada) comprende o consiste en las sustituciones Y444F, Y500F, Y730F, T491V, R585S, R588T, y R487G en la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2, por ejemplo, como se expone en la SEQ ID NO: 2.

Los vectores de ácido nucleico de rAAV a modo de ejemplo útiles de acuerdo con la divulgación incluyen vectores de ácido nucleico de AAV monocatenarios (ss) o autocomplementarios (sc), tales como genomas virales recombinantes monocatenarios o autocomplementarios.

Los métodos para producir partículas de rAAV y vectores de ácido nucleico también se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, Zolotukhin et al. Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods* 28 (2002) 158-167; y las Publicaciones de Patente de EE.UU. Números US20070015238 y US20120322861, que se incorporan en el presente documento por referencia; y plásmidos y kits disponibles en ATCC y Cell Biolabs, Inc.). Por ejemplo, un plásmido que contiene la secuencia del vector de ácido nucleico puede combinarse con uno o más plásmidos auxiliares, por ejemplo, que contienen un gen rep (por ejemplo, que codifica Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40) y un gen cap (que codifica VP1, VP2, y VP3, incluyendo una región VP3 modificada como se describe en el presente documento), y se transfecta en una línea celular productora de modo que la partícula de rAAV pueda empaquetarse y purificarse posteriormente.

En algunas opciones, el uno o más plásmidos auxiliares incluyen un primer plásmido auxiliar que comprende un gen rep y un gen cap y un segundo plásmido auxiliar que comprende un gen E1a, un gen E1b, un gen E4, un gen E2a y un gen VA. En algunas opciones, el gen rep es un gen rep derivado de AAV2, y el gen cap se deriva de AAV2 e incluye modificaciones al gen para producir una proteína de la cápside modificada descrita en el presente documento. Los plásmidos auxiliares, y los métodos para producir dichos plásmidos, se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, los plásmidos pDM, pDG, pDP1rs, pDP2rs, pDP3rs, pDP4rs, pDP5rs, pDP6rs, pDG(R484E/R585E), y pDP8.ape de PlasmidFactory, Bielefeld, Alemania; otros productos y servicios disponibles en Vector Biolabs, Filadelfia, PA; Cellbiolabs, San Diego, CA; Agilent Technologies, Santa Clara, Ca; y Addgene, Cambridge, MA; pxx6; Grimm et al. (1998), Novel Tools for Production and Purification of Recombinant Adenoassociated Virus Vectors, *Human Gene Therapy*, Vol. 9, 2745-2760; Kern, A. et al. (2003), Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids, *Journal of Virology*, Vol. 77, 11072-11081.; Grimm et al. (2003), Helper Virus-Free, Optically Controllable, and Two-Plasmid-Based Production of Adeno-associated Virus Vectors of Serotypes 1 to 6, *Molecular Therapy*, Vol. 7, 839-850; Kronenberg et al. (2005), A Conformational Change in the Adeno-Associated Virus Type 2 Capsid Leads to the Exposure of Hidden VP1 N Termini, *Journal of Virology*, Vol. 79, 5296-5303; y Moullier, P. y Snyder, R.O. (2008), International efforts for recombinant adeno-associated viral vector reference standards, *Molecular Therapy*, Vol. 16, 1185-1188).

A continuación se describe un método de producción de partículas de rAAV no limitantes a modo de ejemplo. Se producen u obtienen uno o más plásmidos auxiliares, que comprenden ORF rep y cap para el serotipo de AAV deseado y los genes adenovirales VA, E2A (DBP) y E4 bajo el control transcripcional de sus promotores nativos. El ORF cap también puede comprender una o más modificaciones para producir una proteína de la cápside modificada como se describe en el presente documento. Las células HEK293 (disponibles de ATCC®) se transfectan mediante transfección mediada por CaPO4, lípidos o moléculas poliméricas tales como Polietilenimina (PEI) con el plásmido o plásmidos auxiliares y un plásmido que contiene un vector de ácido nucleico descrito en el presente documento. Las células HEK293 se incuban a continuación durante al menos 60 horas para permitir la producción de partículas de rAAV. Como alternativa, en otro ejemplo, las líneas celulares estables del productor basadas en Sf9 se infectan con un solo baculovirus recombinante que contiene el vector de ácido nucleico. Como alternativa adicional, en otro ejemplo, las líneas celulares HEK293 o BHK se infectan con un HSV que contiene el vector de ácido nucleico y opcionalmente uno o más HSV auxiliares que contienen ORF rep y cap como se describe en el presente documento y los genes adenovirales VA, E2A (DBP) y E4 bajo el control transcripcional de sus promotores nativos. Las células HEK293, BHK o Sf9 se incuban a continuación durante al menos 60 horas para permitir la producción de partículas de rAAV. Las partículas de rAAV se pueden purificar a continuación usando cualquier método conocido en la técnica o descrito en el presente documento, por ejemplo, mediante gradiente en etapas de yodixanol, gradiente de CsCl, cromatografía o precipitación con polietilenglicol (PEG).

#### **USOS PARA VECTORES RAAV MODIFICADOS POR CÁPSIDE MEJORADOS**

La presente divulgación proporciona composiciones que incluyen una o más de las partículas de rAAV modificadas con cápside de aminoácidos expuestas a la superficie o vectores divulgados comprendidos dentro de un kit para

diagnosticar, prevenir, tratar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad, lesión, trastorno, traumatismo o disfunción de mamífero. Dichos kits pueden ser útiles en el diagnóstico, profilaxis y/o terapia, y particularmente útiles en el tratamiento, prevención y/o mejora de uno o más defectos en el ojo de mamífero como se analiza en el presente documento.

5 La divulgación también proporciona el uso de una composición divulgada en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de una enfermedad, trastorno, disfunción, lesión o traumatismo, incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento, prevención y/o profilaxis de una enfermedad, trastorno o disfunción, y/o la mejora de uno o más síntomas de tal enfermedad, trastorno o disfunción.

10 Asimismo, la divulgación también proporciona un método para tratar o mejorar los síntomas de tal enfermedad, lesión, trastorno o disfunción en uno o ambos ojos de un mamífero, y de un ser humano en particular. Dichos métodos generalmente implican al menos la etapa de administrar a un mamífero que lo necesite, una o más de las partículas de rAAV modificadas con proteína de la cápside de VP3 sustituidas con residuos de aminoácidos expuestos a múltiples superficies como se analiza en el presente documento, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para tratar o mejorar los síntomas de tal enfermedad, lesión, trastorno o disfunción en uno o ambos ojos del mamífero.

15 La divulgación también proporciona un método para proporcionar a un mamífero que lo necesite, una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones de rAAV de la presente divulgación, en una cantidad, y durante un tiempo eficaz para proporcionar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de agente o agentes terapéuticos deseados codificados por uno o más segmentos de ácido nucleico comprendidos dentro del vector de ácido nucleico de rAAV. En algunas opciones, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido, un péptido, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, una ribozima, un ácido nucleico peptídico, un ARNip, un ARNi, un oligonucleótido antisentido, un polinucleótido antisentido, un marcador de diagnóstico, una molécula de diagnóstico, una molécula indicadora, y cualquier combinación de los mismos.

#### COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS QUE COMPRENEN VECTORES RAAV MUTADOS EN CÁPSIDE

20 Un aspecto importante de la presente metodología es el hecho de que las partículas mejoradas de rAAV descritas en el presente documento permiten la administración de títulos más pequeños de partículas virales para lograr la misma eficiencia de transducción que la obtenida usando niveles más altos de partículas de rAAV modificadas en la cápside no superficiales convencionales. Para ese fin, la cantidad de composiciones de AAV y el tiempo de administración de dichas composiciones estarán dentro del alcance del experto en la técnica que se beneficia de las presentes enseñanzas. De hecho, los inventores contemplan que la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones divulgadas puede lograrse mediante una única administración, tal como, por ejemplo, una sola inyección de un número suficiente de partículas infecciosas para proporcionar un beneficio terapéutico al paciente sometido a dicho tratamiento. Como alternativa, en algunas circunstancias, puede ser deseable proporcionar administraciones múltiples o sucesivas de las composiciones de vectores AAV, ya sea durante un periodo relativamente corto, o durante un periodo relativamente prolongado, según se puede determinar por el médico que supervisa la administración de dichas composiciones.

30 Por ejemplo, el número de partículas infecciosas administradas a un mamífero puede ser de aproximadamente  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$ , o incluso más, partículas infecciosas/ml, administradas como una dosis única (o dividida en dos o más administraciones, etc.), según sea necesario para lograr la terapia de la enfermedad o trastorno particular que se está tratando. De hecho, en ciertas opciones, puede ser deseable administrar dos o más composiciones diferentes basadas en partículas de rAAV o vectores, en solitario, o en combinación con uno o más de agentes de diagnóstico diferentes, fármacos, bioactivos, o similares, para lograr los efectos deseados de un régimen o terapia particular. En la mayoría de los regímenes basados en terapia génica vectorizados con rAAV, los inventores contemplan que se requerirán títulos más bajos de partículas infecciosas cuando se usan las partículas de rAAV de la cápside modificada descritas en el presente documento, en comparación con el uso de partículas de rAAV "no modificadas" de tipo silvestre o correspondientes equivalentes.

35 Como se usa en el presente documento, los términos células "genomanipuladas" y "recombinantes" pretenden referirse a una célula en la que se ha introducido un segmento polinucleotídico exógeno (tal como un segmento de ADN que conduce a la transcripción de una molécula biológicamente activa). Por lo tanto, las células genomanipuladas se pueden distinguir de las células de origen natural, que no contienen un segmento de ADN exógeno introducido de forma recombinante. Las células genomanipuladas son, por lo tanto, células que comprenden al menos uno o más segmentos polinucleotídicos heterólogos introducidos por la mano del hombre.

40 Para expresar un agente terapéutico de acuerdo con la presente divulgación, se puede preparar una partícula de rAAV modificada en la cápside que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica un agente terapéutico bajo el control de uno o más promotores. Para poner una secuencia "bajo el control de" un promotor, se posiciona el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción del marco de lectura transcripcional generalmente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 nucleótidos "aguas abajo" de (es decir, 3') del promotor elegido. El promotor "aguas arriba" estimula la transcripción del ADN y promueve la expresión del polipéptido codificado. Este es el significado de la "expresión recombinante" en este contexto. En algunas opciones, las construcciones de vectores recombinantes son

aquellas que incluyen un vector rAAV modificado en la proteína de la cápside que contiene un promotor específico de células EPR o específico de células fotorreceptoras, unido operativamente al menos a un segmento de ácido nucleico que codifica uno o más agentes de diagnóstico, y/o terapéuticos. Dichos vectores se describen en detalle en el presente documento.

5 Cuando se contempla el uso de dichos vectores para la introducción de una o más proteínas exógenas, polipéptidos, péptidos, ribozimas y/o oligonucleótidos antisentido, en una célula particular transfectada con el vector, se pueden emplear los vectores rAAV modificados en la cápside divulgados en el presente documento para administrar uno o más polinucleótidos exógenos a una célula huésped seleccionada, por ejemplo, a una o más células seleccionadas dentro del ojo de mamífero.

15 Las construcciones genéticas de la presente divulgación pueden prepararse en diversas composiciones, y pueden formularse en vehículos farmacéuticos apropiados para administración a sujetos humanos o animales. Las construcciones basadas en partículas de rAAV y vectores de la presente divulgación proporcionan productos terapéuticos nuevos y útiles para el tratamiento, control y mejora de síntomas de diversos trastornos, enfermedades, lesiones y/o disfunciones del ojo de mamífero, y en particular enfermedades hereditarias que implican mutaciones en una o más proteínas específicas de PR o EPR.

20 En algunas opciones, el número de partículas virales administradas a un sujeto puede ser del orden que varía de  $10^6$  a  $10^{14}$  partículas/ml o  $10^3$  a  $10^{15}$  partículas/ml, o cualquier valor entre los mismos para cualquier rango, tal como, por ejemplo, aproximadamente  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$ , o  $10^{14}$  partículas/ml. En una opción, se pueden administrar partículas virales de más de  $10^{13}$  partículas/ml. En algunas opciones, el número de partículas virales administradas a un sujeto puede ser del orden que varía de  $10^6$  a  $10^{14}$  genomas de vectores (vg)/ml o de  $10^3$  a  $10^{15}$  vg/ml, o cualquier valor entre los mismos para cualquier rango, tal como, por ejemplo, aproximadamente  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$ ,  $10^{12}$ ,  $10^{13}$ , o  $10^{14}$  vg/ml. En una opción, se administran partículas virales de más de  $10^{13}$  vg/ml. Las partículas virales pueden administrarse como una dosis única, o dividirse en dos o más administraciones, según sea necesario, para lograr la terapia de la enfermedad o trastorno particular que se está tratando. En algunas opciones, se administran de 0,0001 ml a 10 ml, por ejemplo, 0,001 ml, 0,01 ml, 0,1 ml, 1 ml, 2 ml, 5 ml o 10 ml, a un sujeto.

30 En algunas opciones, la divulgación proporciona formulaciones de una o más composiciones basadas en virus divulgadas en el presente documento en soluciones farmacéuticamente aceptables para su administración a una célula o un animal, ya sea en solitario o en combinación con una o más modalidades diferentes de terapia, y en particular, para la terapia de células, tejidos y enfermedades humanas que afectan al hombre.

35 Si se desea, las partículas de rAAV descritas en el presente documento también se pueden administrar en combinación con otros agentes, tales como, por ejemplo, proteínas o polipéptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos, incluyendo una o más administraciones sistémicas o tópicas de polipéptidos terapéuticos, fragmentos biológicamente activos, o variantes de los mismos. De hecho, prácticamente no hay límite para otros componentes que también pueden incluirse, dado que los agentes adicionales no causan un efecto adverso significativo al contacto con las células diana o los tejidos del huésped. Por lo tanto, las partículas de rAAV pueden administrarse junto con diversos otros agentes según se requiera en el caso particular. Dichas composiciones pueden purificarse a partir de células huésped u otras fuentes biológicas, o como alternativa, pueden sintetizarse químicamente como se describe en el presente documento.

45 La formulación de excipientes y soluciones transportadoras farmacéuticamente aceptables es bien conocida por los expertos en la técnica, como lo es el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para utilizar las composiciones concretas descritas en el presente documento en diversos regímenes de tratamiento, incluyendo, por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravítrea, intraocular, intravenosa, intranasal, intraarticular, e intramuscular.

50 Normalmente, estas formulaciones pueden contener al menos aproximadamente el 0,1 % del agente terapéutico (por ejemplo, partícula de rAAV) o más, aunque el porcentaje del(de los) principio(s) activo(s) puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 1 o el 2 % y aproximadamente el 70 % o el 80 % o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de agente o agentes terapéuticos en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal manera que se obtendrá una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Factores tales como la solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, ruta de administración, vida media del producto, así como otras consideraciones farmacológicas se contemplarán por un experto en la técnica de preparación de dichas formulaciones farmacéuticas, y como tales, pueden ser deseables diversas dosificaciones y regímenes de tratamiento.

60 En ciertas circunstancias, será deseable administrar partículas de rAAV en composiciones farmacéuticas adecuadamente formuladas divulgadas en el presente documento, ya sea por vía subcutánea, intraocular, intravítrea, parenteral, subcutánea, intravenosa, intracerebro-ventricular, intramuscular, intratecal, oral, intraperitoneal, por inhalación oral o nasal, o por inyección directa a una o más células, tejidos u órganos por inyección directa. Las formas farmacéuticas de las composiciones adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles. En algunas opciones, la forma es estéril y fluida en la medida en que exista una fácil inyectabilidad. En

algunas opciones, la forma es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conserva contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, solución salina, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra la partícula de rAAV. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos los de aceite de petróleo tal como aceite mineral, aceite vegetal, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja y aceite de sésamo, aceite animal, o aceite de origen sintético. Se pueden emplear también soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol como vehículos líquidos.

Las composiciones de la presente divulgación se pueden administrar al sujeto que se está tratando por rutas estándar incluyendo, pero sin limitación, pulmonar, intranasal, oral, inhalación, parenteral tal como intravenosa, tópica, transdérmica, intradérmica, transmucosa, intraperitoneal, intramuscular, intracapsular, intraorbital, intravítrea, intracardiaca, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e inyección intraesternal.

Para la administración de una solución acuosa inyectable, por ejemplo, la solución puede tamponarse de forma adecuada, si es necesario, y el diluyente líquido se vuelve en primer lugar isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, intravítrea, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la técnica conocerán un medio acuoso estéril que se puede emplear a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación puede disolverse en 1 ml de solución de NaCl isotónica y se añade tanto a 1000 ml de fluido de hipodermocilisis como se inyecta en el sitio propuesto de la infusión, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Puede producirse alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para el sujeto individual. Además, para administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad, y de seguridad y pureza generales según lo exigen, por ejemplo, los estándares de la FDA Office of Biologics.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando las partículas de rAAV en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los demás ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguidos de esterilización por filtrado. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación a modo de ejemplo son las técnicas de secado al vacío y liofilización, que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

La cantidad de composiciones de partículas de AAV y el tiempo de administración de dichas composiciones estarán dentro del alcance del experto en la técnica que se beneficia de las presentes enseñanzas. Es probable, sin embargo, que la administración de

cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones divulgadas pueda lograrse mediante una única administración, tal como, por ejemplo, una sola inyección de un número suficiente de partículas virales para proporcionar un beneficio terapéutico al paciente sometido a dicho tratamiento. Como alternativa, en algunas circunstancias, puede ser deseable proporcionar administraciones múltiples o sucesivas de las composiciones, ya sea durante un periodo relativamente corto, o durante un periodo relativamente prolongado, según se puede determinar por el médico que supervisa la administración de dichas composiciones.

La composición puede incluir partículas de rAAV o vectores de ácido nucleico en solitario, o en combinación con uno o más principios activos adicionales, que pueden obtenerse a partir de fuentes naturales o recombinantes o sintetizarse químicamente.

#### **DEFINICIONES A MODO DE EJEMPLO**

De acuerdo con la presente divulgación, los polinucleótidos, segmentos de ácido nucleico, secuencias de ácido nucleico y similares, incluyen, pero sin limitación, ADN (incluyendo y no limitado a ADN genómicos o extragenómicos), genes, ARN de ácidos nucleicos peptídicos (PNA) (incluyendo, pero sin limitación, ARNr, ARNm y ARNt), nucleósidos, y segmentos de ácido nucleico adecuados obtenidos de fuentes naturales, sintetizados químicamente, modificados, o preparados de otro modo o sintetizados en su totalidad o en parte por la mano del hombre.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual

pertenece la presente divulgación. Aunque puede usarse cualquier método y composición similar o equivalente a los descritos en este documento en la práctica o ensayo de la presente divulgación, en el presente documento se describen los métodos y composiciones preferentes. Para los fines de la presente divulgación, a continuación se definen los siguientes términos:

5 El término "sujeto", como se usa en el presente documento, describe un organismo, incluyendo mamíferos tales como primates, al que se puede proporcionar tratamiento con las composiciones de acuerdo con la presente divulgación. Las especies de mamíferos que pueden beneficiarse de los métodos de tratamiento divulgados incluyen, pero sin limitación, simios; chimpancés; orangutanes; seres humanos; monos; animales domesticados tales como perros y  
10 gatos; ganado tales como caballos, ganado vacuno, cerdos, ovejas, cabras y pollos; y otros animales tales como ratones, ratas, cobayas y hámsteres.

El término "tratamiento" o cualquier variación gramatical del mismo (por ejemplo, tratar, que trata y tratamiento, etc.), como se usa en el presente documento, incluye, pero sin limitación, aliviar un síntoma de una enfermedad o afección; y/o reducir, suprimir, inhibir, minimizar, mejorar o afectar a la progresión, gravedad, y/o alcance de una enfermedad o afección.

El término "cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que es capaz de tratar o mejorar una enfermedad o afección, o de otra manera es capaz de producir un efecto terapéutico pretendido.

20 El término "promotor", como se usa en el presente documento, se refiere a una región o regiones de una secuencia de ácido nucleico que regula la transcripción.

El término "elemento regulador", como se usa en el presente documento, se refiere a una región o regiones de una secuencia de ácido nucleico que regula la transcripción. Los elementos reguladores a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitación, potenciadores, elementos postranscripcionales, secuencias de control transcripcional y similares.

25 El término "vector", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de ácido nucleico (normalmente compuesta por ADN) capaz de replicarse en una célula huésped y/o a la que puede unirse operativamente otro segmento de ácido nucleico para producir replicación del segmento adjunto. Un plásmido, cósmido, o un virus es un vector a modo de ejemplo.

El término "corresponde sustancialmente a", "sustancialmente homólogo", o "identidad sustancial", como se usa en el presente documento, representa una característica de un ácido nucleico o una secuencia de aminoácidos, en la que un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos seleccionados tiene al menos aproximadamente 70 o aproximadamente 35 75 por ciento de identidad de secuencia en comparación con un ácido nucleico de referencia o secuencia de aminoácidos seleccionada. Más normalmente, la secuencia seleccionada y la secuencia de referencia tendrán al menos aproximadamente el 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 o incluso el 85 por ciento de identidad de secuencia, y más preferiblemente, al menos aproximadamente el 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95 por ciento de identidad de  
40 secuencia. Aún más preferiblemente, las secuencias altamente homólogas a menudo comparten una identidad de secuencia mayor de al menos aproximadamente el 96, 97, 98 o 99 por ciento entre la secuencia seleccionada y la secuencia de referencia con la que se comparó.

El porcentaje de identidad de secuencia se puede calcular sobre la longitud total de las secuencias a comparar, o se puede calcular excluyendo pequeñas deleciones o adiciones que suman menos de aproximadamente el 25 por ciento, etc., de la secuencia de referencia elegida. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, tal como una porción de un gen o secuencia de flanqueo, o una porción repetitiva de un cromosoma. Sin embargo, en el caso de la homología de secuencia de dos o más secuencias de polinucleótidos, la secuencia de referencia comprenderá normalmente al menos aproximadamente 18-25 nucleótidos, más normalmente al menos aproximadamente de 26 a 35 nucleótidos, e incluso más normalmente al menos aproximadamente 40, 50, 60, 70, 80, 50 90, o incluso 100 o más nucleótidos.

Cuando se desean fragmentos altamente homólogos, el grado de identidad porcentual entre las dos secuencias será de al menos aproximadamente el 80 %, preferiblemente de al menos aproximadamente el 85 %, y más preferiblemente de aproximadamente el 90 % o el 95 % o más, según se determina fácilmente por uno o más de los algoritmos de comparación de secuencias bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, el análisis del programa FASTA descrito por Pearson y Lipman (1988).

La expresión "unido operativamente", como se usa en el presente documento, se refiere a que las secuencias de ácido nucleico que se unen son normalmente contiguas, o sustancialmente contiguas y cuando es necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en marco de lectura. Sin embargo, dado que los potenciadores generalmente funcionan cuando están separados del promotor por varias kilobases y las secuencias intrónicas pueden tener longitudes variables, algunos elementos polinucleotídicos pueden estar unidos operativamente pero no son contiguos.

65 Opciones **A MODO DE EJEMPLO**

A continuación se proporcionan opciones a modo de ejemplo, no limitantes.

- 5 Opción 1. Un vector viral recombinante adenoasociado (rAAV) que comprende: un polinucleótido que codifica una proteína de la cápside modificada, en el que la proteína de la cápside modificada comprende al menos un primer aminoácido no nativo en una posición que corresponde a un residuo de aminoácido expuesto a la superficie en la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2, y en el que, además, la eficiencia de transducción de un virión que comprende la proteína de la cápside modificada es mayor que la de un virión que comprende una proteína de la cápside de tipo silvestre no modificada correspondiente, y en el que el polinucleótido comprende además un segmento de ácido nucleico que codifica una molécula de diagnóstico o terapéutica unida operativamente a un promotor que es capaz de expresar el segmento de ácido nucleico en uno o más fotorreceptores o células del epitelio pigmentario de la retina de un ojo de mamífero, en el que la proteína de la cápside modificada comprende tres o más sustituciones de aminoácidos no nativos en las posiciones correspondientes a tres residuos de aminoácidos expuestos a la superficie distintos de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2; o a tres residuos de aminoácidos expuestos a la superficie distintos correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10, o cualquier combinación de las mismas.
- 10
- 15
- 20 Opción 2. El vector rAAV de la opción 1, en el que las sustituciones de aminoácidos no nativos tienen lugar en los residuos de aminoácidos: (a) Y444, Y500, e Y730; (b) Y272, Y444, Y500, e Y730; (c) Y444, T491, Y500, R585, R588, R487, e Y730; (d) Y444, T491, Y500, R585, e Y730; (e) Y444, T491, Y500, R588, e Y730; (f) Y444, T491, Y500, R585, R588, e Y730; (g) Y444, T491, Y500, e Y730; (h) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588, R487, e Y730; (i) Y444, T491, Y500, E530, R585, e Y730; (j) Y444, T491, Y500, E530, R588, e Y730; (k) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588, e Y730; o (l) Y444, T491, Y500, E530, e Y730; de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o en las posiciones de aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10, o cualquier combinación de las mismas.
- 25
- 30
- 35 Opción 3. El vector rAAV de la opción 2, en la que las sustituciones de aminoácidos no nativos comprenden: (a) Y444F, Y500F, e Y730F; (b) Y272F, Y444F, Y500F, e Y730F; (c) Y444F, T491V, Y500F, R585S, R588T, R487G, e Y730F; (d) Y444F, T491V, Y500F, R585S, e Y730F; (e) Y444F, T491V, Y500F, R588T, e Y730F; (f) Y444F, T491V, Y500F, R585S, R588T, e Y730F; (g) Y444F, T491V, Y500F, e Y730F; (h) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, R588T, R487G, e Y730F; (i) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, e Y730F; (j) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R588T, e Y730F; (k) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, R588T, e Y730F; o (l) Y444F, T491V, Y500F, E530K, e Y730F; de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o en las posiciones de aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10, o cualquier combinación de las mismas.
- 40
- 45 Opción 4. El vector rAAV de la opción 1, en el que la eficiencia de transducción de un virión que comprende el vector modificado es de aproximadamente 2 a aproximadamente 50 veces mayor en una o más células fotorreceptoras o EPR que la de un virión que comprende una proteína de la cápside de tipo silvestre no modificada correspondiente.
- 50 Opción 5. El vector rAAV de la opción 1, en el que el segmento de ácido nucleico comprende además un potenciador, una secuencia reguladora postranscripcional, una señal de poliadenilación, o cualquier combinación de los mismos, unidos operativamente al segmento de ácido nucleico que codifica el agente terapéutico.
- 55 Opción 6. El vector rAAV de la opción 1, en el que el segmento de ácido nucleico se expresa o se codifica en una o más células fotorreceptoras o células EPR de un ojo de mamífero, un polipéptido, un péptido, una ribozima, un ácido nucleico peptídico, un ARNip, un ARNi, un oligonucleótido antisentido, un polinucleótido antisentido, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno, o cualquier combinación de los mismos.
- 60 Opción 7. Un método para proporcionar a un mamífero que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico seleccionado, comprendiendo el método administrar a uno o ambos ojos del mamífero, una cantidad del vector rAAV de la opción 1; y durante un tiempo eficaz para proporcionar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico seleccionado.
- 65 Opción 8. El método de la opción 7, en el que el método comprende administrar por vía intravítrea o subretiniana a uno o ambos ojos del mamífero, una cantidad del vector rAAV de la opción 1; y durante un tiempo eficaz para proporcionar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico seleccionado.
- Opción 9. Un método para tratar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad, un trastorno, una disfunción, una lesión, una afección anormal, o un traumatismo en un mamífero, comprendiendo el método, administrar por vía

intravítrea a uno o ambos ojos del mamífero que lo necesite, el vector rAAV de la opción 1, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para tratar o mejorar el uno o más síntomas de la enfermedad, el trastorno, la disfunción, la lesión, la afección anormal, o el traumatismo en el mamífero.

5 Opción 10. Un método para expresar un segmento de ácido nucleico en una o más células fotorreceptoras o una o más células EPR de un mamífero, comprendiendo el método: administrar por vía subretiniana o intravítrea a uno o ambos ojos del mamífero el vector rAAV de la Opción 1, en el que el polinucleótido comprende además al menos un primer polinucleótido que comprende un promotor específico de células PR o EPR unido operativamente al menos a un primer segmento de ácido nucleico que codifica un agente terapéutico, durante un tiempo eficaz para producir el agente terapéutico en una o más células PR o células RPE del mamífero.

Opción 11. El método de la opción 10, en el que el mamífero es un ser humano.

15 Opción 12. El método de la opción 11, en el que el ser humano es un neonato, un recién nacido, un bebé o un joven.

Opción 13. El método de la opción 11, en el que el ser humano tiene, se sospecha que tiene, está en riesgo de desarrollar, o ha sido diagnosticado con un trastorno de la retina, una enfermedad de la retina, una distrofia de la retina, o cualquier combinación de los mismos.

20 Opción 14. El método de la opción 11, en el que el trastorno de la retina, la enfermedad de la retina, o la distrofia de la retina es hereditaria.

25 Opción 15. El método de la opción 11, en el que la producción del agente terapéutico a) conserva una o más células fotorreceptoras o una o más células EPR, b) restaura una o más funciones mediadas por bastones y/o conos, c) restaura el comportamiento visual en uno o ambos ojos, o d) cualquier combinación de los mismos.

30 Opción 16. El método de la opción 11, en el que la producción del agente terapéutico persiste en una o más células fotorreceptoras o en una o más células EPR sustancialmente durante un periodo de al menos tres meses después de una administración inicial del vector rAAV. en uno o ambos ojos del mamífero.

Opción 17. El método de la opción 16, en el que la producción del agente terapéutico persiste en una o más células de la retina sustancialmente durante un periodo de al menos seis meses después de una administración inicial del vector rAAV en uno o ambos ojos del mamífero.

35 Opción 18. El método de la opción 10, en el que el vector es un rAAV autocomplementario (scAAV).

Opción 19. El método de la opción 10, en el que el vector se proporciona a uno o ambos ojos mediante la administración de una partícula viral adenoasociada infecciosa, un virión de rAAV, o una pluralidad de partículas de rAAV infecciosas.

40 Opción 20. El método de v10, en el que el agente terapéutico es un agonista, un antagonista, un factor antiapoptosis, un inhibidor, un receptor, una citocina, una citotoxina, un agente eritropoyético, una glucoproteína, un factor de crecimiento, un receptor del factor de crecimiento, una hormona, un receptor hormonal, un interferón, una interleucina, un receptor de interleucina, un factor de crecimiento nervioso, un péptido neuroactivo, un receptor de péptido neuroactivo, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una proteína descarboxilasa, una proteína cinasa, un inhibidor de proteína cinasa, una enzima, una proteína de unión al receptor, una proteína de transporte o un inhibidor de la misma, un receptor de serotonina, o un inhibidor de captación de la misma, una serpina, un receptor de serpina, un supresor tumoral, un quimioterapéutico, o cualquier combinación de los mismos.

## 50 Ejemplos

### Ejemplo 1 - transducción altamente selectiva de pr y células epr después de la

#### ENTREGA SUBRETINIANA DE VECTORES RAAV MUTADOS EN LA CÁPSIDE

55 La mayoría de las enfermedades de la retina hereditarias son causadas por mutaciones en genes expresados en fotorreceptores (PR) y el epitelio pigmentario de la retina (EPR). Un objetivo clave de la presente divulgación fue el desarrollo de partículas de rAAV que podrían transducir y administrar eficientemente el transgén terapéutico en un vector de ácido nucleico de rAAV a uno o ambos tipos de células con eficiencias de transducción, y/o especificidades de tejido que eran mayores que las de las partículas no modificadas de tipo silvestre. En opciones a modo de ejemplo, se desarrollaron y se ensayaron partículas de AAV basadas en el serotipo 2 mejoradas *in vitro* y/o *in vivo*.

65 Estas partículas mutadas en la cápside de rAAV de "segunda generación" mejoran la transducción de PR y EPR al mejorar la capacidad del vector para entregar su carga al núcleo. En ejemplos ilustrativos, dichas partículas mejoradas se crearon mutando varios residuos de tirosina en la superficie de la cápside del vector en aminoácidos no nativos. Por ejemplo, en algunas opciones, se desarrolló una partícula triple mutante de rAAV que contenía tres mutaciones de tirosina a fenilalanina (Y → F) en los residuos 444, 500 y 730 de la proteína AAV2 de tipo silvestre. La partícula



resultante mostró una transducción significativamente mayor en relación con la partícula de AAV2 nativa, no modificada, de la que se derivaba el mutante.

5 Esta partícula a modo de ejemplo, designada AAV2(Y444F+Y500F+Y730F), y que recibió la notación abreviada "AAV2(tripleY→F)" mostró una mayor eficiencia de transducción en diversas líneas celulares tanto *in vitro* como también en múltiples tejidos *in vivo* en comparación con la partícula de AAV2 no modificada de tipo silvestre. La adición de una mutación de treonina-valina (T→V) en el residuo 491 en la partícula AAV2(tripleY→F) mejoró *adicionalmente* el rendimiento *in vitro* e *in vivo*, dando como resultado la creación de partícula de AAV2 con mutación cuádruple de "tercera generación", que los inventores designaron AAV2(tripleY→F+T491V), y también se hace referencia en el  
10 presente documento por su notación abreviatura como "AAV2MAX". El rendimiento mejorado de ambas clases de estas partículas y vectores de ácido nucleico contenidos dentro de estas partículas fue el resultado de su capacidad mejorada para dirigir el tráfico al núcleo y descargar su "carga" en comparación con las partículas de tipo silvestre de AAV2, cuyos residuos de tirosina y treonina no modificados sirven como señales para la degradación proteosómica.

15 También se construyó una serie adicional de nuevas partículas basadas en AAV2 y se evaluó su capacidad para transducir fotorreceptores y células EPR después de la inyección intravítrea en un modelo murino. Los inventores demostraron que la capacidad de estas partículas mutantes de la cápside para transducir la retina neural dependía de su capacidad para unirse al proteoglicano de heparán sulfato (HS) en la membrana limitante interna (ILM), una membrana basal típica que forma la unión vitreoretiniana. Debido a que el receptor celular primario para AAV2 es HS,  
20 los vectores basados en este serotipo exhiben una transducción significativamente mejorada en relación con otros serotipos tal como AAV5, que se une al ácido siálico (un componente que está ausente de la ILM).

Al comparar los perfiles de transducción de diversas partículas de AAV2 mutadas en la cápside Y→F/T→V después de la inyección intravítrea en ratones, y posteriormente analizando las afinidades respectivas por HS (usando cromatografía en columnas de heparina agarosa), los inventores confirmaron que la afinidad de cada cápside por HS dictaba el perfil de transducción de la partícula resultante. Se descubrió que cuanto más estrechamente se unía, menos "penetraba" en la partícula a través de la retina y viceversa. En pocas palabras, para transducir los PR y EPR desde el vítreo, estos vectores deben unirse eficazmente a HS (para unirse a la ILM), pero no con tanta fuerza que permanezcan secuestrados allí. Las variantes a modo de ejemplo de AAV2 que transducían principalmente la retina  
30 interna del vítreo (por ejemplo, AAV2wt y AAV2tripleY→F) tenían una afinidad muy fuerte por HS, mientras que aquellos vectores que transducían fotorreceptores (por ejemplo, AAV2quadY→F y AAV2quadY→F+T→V) solo tenían afinidad moderada.

Con esta información, también se desarrolló un conjunto adicional de variantes de la cápside de "cuarta generación" usando el vector AAV2MAX como plantilla. Se hicieron mutaciones informadas por estructura de residuos de unión a HS conocidos en la cápside de AAV2, para generar vectores que demostraban un rango de afinidades por HS (o, en ciertos mutantes, ninguna afinidad por HS en absoluto). Una de estas construcciones, un mutante heptuple de AAV2, designado AAV2(Y444F+Y500F+Y730F+T491V+R585S+ R588T+R487G, y al que se le ha dado la notación abreviada "AAV2MAXΔHS" no tenía esencialmente ninguna afinidad por HS. Como estaba previsto, este vector no transdujo  
40 células *in vitro* o en retina *in vivo*, cuando se administraron mediante inyección intravítrea. Sorprendentemente, sin embargo, cuando el vector AAV2MAXΔHS se administró por vía subretinal, fue altamente eficiente en la transducción de células PR y EPR.

De hecho, los niveles de expresión transgénica mediados por la partícula de cuarta generación, AAV2MAXΔHS, se alcanzaron usando serotipos tales como AAV5, que están bien establecidos en la bibliografía científica como "fotorreceptores-fílicos". Es importante destacar que, en las partículas basadas en AAV2MAXΔHS, la transducción de fotorreceptores se produjo *en ausencia de unión a HS*. Por lo tanto, sin desear quedar ligado a la teoría, otro par ligando-receptor puede ser responsable de la unión de vectores tales como AAV2MAXΔHS a la superficie de los fotorreceptores. Los inventores razonaron que era probable que los residuos responsables de este emparejamiento estuvieran "desenmascarados" por la mutación de la huella de unión a HS canónica.  
50

Se razonó que las partículas de rAAV creadas usando el "esqueleto" AAV2MAXΔHS, así como construcciones análogas que exhibían una unión reducida o deteriorada a HS, podrían servir como alternativas útiles a los vectores convencionales basados en serotipos de AAV5 o AAV8 para la administración eficiente de transgén a fotorreceptores después de la inyección subretiniana.  
55

Para probar esta teoría, se crearon otras tres partículas mutadas en la cápside basadas en AAV2MAXΔHS adicionales, incluyendo:

60 AAV2(Y444F+Y500F+Y730F+T491V+R585S),  
AAV2(Y444F+Y500F+Y730F+T491V+R588T), y  
AAV2(Y444F+Y500F+Y730F+T491V+R585S+R588T).

65 Cada una de estas partículas demostró una afinidad modificada por HS, y se predijo que recapitularían la capacidad de transducir PR y EPR desde el vítreo como se ve con vectores tales como AAV2 (quadY→F) y AAV2(quadY→F+T→V), mientras se mantienen las eficiencias máximas de entrada postcelular de las construcciones

de partículas basadas en AAV2MAX.

Los inventores también han creado otra construcción modificada de partículas de rAAV2 que se sintetizó a partir de AAV2MAX $\Delta$ HS. Esta variante contenía una mutación E $\rightarrow$ K en la posición de aminoácido 530, que está fuera de la huella de unión a HS de AAV2. Se espera que el análisis de la construcción AAV2MAX $\Delta$ HS+E530K muestre una afinidad por HS restaurada, aunque no interfiera con la nueva huella receptor-ligando que se desenmascaró en la familia de mutantes  $\Delta$ HS.

**Ejemplo 2 - la afinidad por el sulfato de heparán dicta la transducción de los pr del vítreo por variantes de aav2 mutadas en la cápside**

El desarrollo de partículas de AAV capaces de transducir eficientemente la retina del vítreo proporciona un importante paso adelante en el traslado de la terapia génica a la clínica. Se sabe que la mutagénesis de los residuos de tirosina expuestos a la superficie previene la degradación proteosómica y aumenta el transporte nuclear de AAV aumentando así su eficiencia de transducción. Una variante con cuatro mutaciones Y $\rightarrow$ F, AAV(quadY $\rightarrow$ F), transdujo las capas distales de la retina, incluidos los fotorreceptores, cuando se administran al vítreo. El receptor celular primario para AAV2 es el heparán sulfato (HS), y el proteoglicano de heparán sulfato (HSPG) es un componente primario de la membrana limitante interna. Los inventores plantearon la hipótesis de que la capacidad relativa de "penetración" de los mutantes de la cápside se basa en sus respectivas afinidades por HS.

**Métodos:** Las partículas basadas en AAV2 que contienen cápsides mutadas que contienen combinaciones de mutaciones Y $\rightarrow$ F y/o T $\rightarrow$ V se analizaron por cromatografía en columna de heparina agarosa para determinar las afinidades respectivas. Se creó un nuevo conjunto de variantes de cápside utilizando una variante Y $\rightarrow$ F triple/T $\rightarrow$ V única (AAV2MAX) como plantilla. Se realizaron mutaciones informadas por estructura de los residuos de unión a HS conocidos de AAV2 con el objetivo de generar vectores con un rango de unión a HS o sin unión alguna (AAV2MAX $\Delta$ HS). Estas y otras variantes relacionadas se están evaluando para determinar la eficacia de la transducción *in vitro* e *in vivo*, mediante inyecciones subretinianas e intravítreas en un modelo animal murino.

**Resultados:** Las variantes de AAV2 que transducen principalmente la retina interna del vítreo (AAV2wt y AAV2tripleY $\rightarrow$ F) tienen una fuerte afinidad por HS, mientras que las que transducen fotorreceptores tienen una afinidad moderada (AAV2quadY $\rightarrow$ F y AAV2quadY $\rightarrow$ F+T $\rightarrow$ V). AAV2MAX $\Delta$ HS, la variante con unión a HS ablacionada no transdujo las células *in vitro*, pero fue altamente eficiente en la transducción de fotorreceptores cuando se administró por vía subretiniana.

**Conclusión:** La afinidad por HS de las partículas basadas en AAV2 es un factor clave en su capacidad para transducir fotorreceptores del vítreo. La transducción de fotorreceptores por AAV2 no depende de la unión a HS, lo que sugiere que otro par ligando-receptor es responsable de la unión del virus a la superficie de los fotorreceptores. Por lo tanto, es poco probable que los cambios en la afinidad por HS afecten negativamente al reconocimiento del tipo de célula diana (fotorreceptores), lo que sugiere que se pueden lograr mejoras adicionales en la terapia génica de las células PR o RPE utilizando las partículas, los vectores y los métodos descritos en el presente documento.

REFERENCIAS

Acland, GM et al., "Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness," *Nat. Genet.*, 28:92-95 (2001).

Akache, B et al., "The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9," *J. Virol.*, 80:9831-9836 (2006).

Ali, RR et al., "Gene transfer into the mouse retina mediated by an adeno-associated viral vector," *Hum. Mol. Genet.*, 5:591-594 (1996).

Allocca, M et al., "Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors," *J. Virol.*, 81:11372-11380 (2007).

Al-Ubaidi, MR et al., "Proteomics profiling of the cone photoreceptor cell line, 661W," *Adv. Exp. Med. Biol.*, 613:301-311 (2008).

Aslanidi, GV et al., "Optimization of the capsid of recombinant 1 adeno-associated virus 2 (AAV2) vectors: The final threshold?" *PLoS One*, 8(3):e59142 (2013).

Aslanidi, GV et al., "High-efficiency transduction of human monocyte-derived dendritic cells by capsid-modified recombinant AAV2 vectors," *Vaccine*, 30:3908-3917 (2012).

Auricchio, A et al., "Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model," *Hum. Mol. Genet.*, 10:3075-3081 (2001).

Bainbridge, JW et al., "Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis," *N. Engl. J. Med.*, 358:2231-2239 (2005).

Bartel, MA et al., "Directed evolution of novel adeno-associated viruses for therapeutic gene delivery," *Gene Ther.*, 19:694-700 (2012).

Beltran, WA et al., "rAAV2/5 gene-targeting to rods: dose-dependent efficiency and complications associated with different promoters," *Gene Ther.*, 17:1162-1174 (2010).

Bennett, J et al., "Stable transgene expression in rod photoreceptors after recombinant adeno-associated virus-

- mediated gene transfer to monkey retina," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:9920-9925 (1999).
- Boye, SE et al., "The human rhodopsin kinase promoter in an AAV5 vector confers rod- and cone-specific expression in the primate retina," *Hum. Gene Ther.*, 23:1101-1115 (2012).
- 5 Boye, SE et al., "Functional and behavioral restoration of vision by gene therapy in the guanylate cyclase-1 (GC1) knockout mouse," *PLoS One*, 5:e11306 (2010).
- Boye, SL et al., "Long-term preservation of cone photoreceptors and restoration of cone function by gene therapy in the guanylate cyclase-1 knockout (GC1KO) mouse," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 52:7098-7108 (2011).
- 10 Burger, C et al., "Recombinant AAV viral vectors pseudotyped with viral capsids from serotypes 1,2, and 5 display differential efficiency and cell tropism after delivery to different regions of the central nervous system," *Mol. Ther.*, 10:302-317 (2004).
- Chai, L and Morris, JE, "Distribution of heparan sulfate proteoglycans in embryonic chicken neural retina and isolated inner limiting membrane," *Curr. Eye Res.*, 13:669-677 (1994).
- Chang B et al., "In-frame deletion in a novel centrosomal/ciliary protein CEP290/NPHP6 perturbs its interaction with RPGR and results in early-onset retinal degeneration in the rd16 mouse," *Hum. Mol. Genet.*, 15(11):1847-57 (2006).
- 15 Cho, EY et al., "Expression pattern of glycoconjugates in rat retina as analysed by lectin histochemistry," *Histochem. J.*, 34:589-600 (2002).
- Cideciyan, AV et al., "Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year," *Hum. Gene Ther.*, 20:999-1004 (2009).
- 20 Dalkara, D et al., "Inner limiting membrane barriers to AAV-mediated retinal transduction from the vitreous," *Mol. Ther.*, 17:2096-2102 (2009).
- Daya, S and Berns, KI, "Gene therapy using adeno-associated virus vectors," *Clin. Microbiol. Rev.*, 21:583-593 (2008).
- Gabriel, N et al., "Bio-engineering of AAV-2 capsid at specific serine, threonine or lysine residues improves its transduction efficiency *in vitro* and *in vivo*," *Hum. Gene Ther., Methods*, 24(2):80-93 (2013).
- 25 Gregg RG et al., "Identification of the gene and the mutation responsible for the mouse nob phenotype," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44:378-384 (2003).
- Haire, SE et al., "Light-driven cone arrestin translocation in cones of postnatal guanylate cyclase-1 knockout mouse retina treated with AAV-GC1," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47:3745-3753 (2006).
- Jacobson, SG et al., "Safety of recombinant adeno-associated virus type 2-RPE65 vector delivered by ocular subretinal injection," *Mol. Ther.*, 13:1074-1084 (2006).
- 30 Jacobson, SG et al., "Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years," *Arch. Ophthalmol.*, 130:9-24 (2012).
- Kaludov, N et al., "Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity," *J. Virol.*, 75:6884-6893 (2001).
- 35 Karali, M et al., "MicroRNA-restricted transgene expression in the retina," *PLoS One*, 6:e22166 (2011).
- Karali, M et al., "miRNeye: a microRNA expression atlas of the mouse eye," *BMC Genomics*, 11:715 (2010). Khani, SC et al., "AAV-mediated expression targeting of rod and cone photoreceptors with a human rhodopsin kinase promoter," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 48:3954-3961 (2007).
- 40 Klimczak, RR, "A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Muller cells," *PLoS One*, 4:e7467 (2009).
- Li, C et al., "Single amino acid modification of adeno-associated virus capsid changes transduction and humoral immune profiles," *J. Virol.*, 86:7752-7759 (2012).
- Lotery, AJ et al., "Adeno-associated virus type 5: transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina," *Hum. Gene Ther.*, 14:1663-1671 (2003).
- 45 Maguire, AM et al., "Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis," *N. Engl. J. Med.*, 358:2240-2248 (2008).
- Matsumoto, B et al., "Topographic variations in the rabbit and primate internal limiting membrane," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 25:71-82 (1984).
- 50 Mussolino, C et al., "AAV-mediated photoreceptor transduction of the pig cone-enriched retina," *Gene Ther.*, 18:637-645 (2011).
- Pang, JJ et al., "Long-term retinal function and structure rescue using capsid mutant AAV8 vector in the rd10 mouse, a model of recessive retinitis pigmentosa," *Mol. Ther.*, 19:234-242 (2011).
- Pang, JJ et al., "AAV-mediated cone rescue in a naturally occurring mouse model of CNGA3-achromatopsia," *PLoS One*, 7:e35250 (2012).
- 55 Pardue MT et al., "A naturally occurring mouse model of X-linked congenital stationary night blindness," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39:2443-2449 (1998).
- Petersen-Jones, SM et al., "AAV retinal transduction in a large animal model species: comparison of a self-complementary AAV2/5 with a single-stranded AAV2/5 vector," *Mol. Vis.*, 15:1835-1842 (2009).
- Petrs-Silva, H et al., "Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina," *Mol. Ther.*, 19:293-301 (2011).
- 60 Petrs-Silva, H et al., "High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors," *Mol. Ther.*, 17:463-471 (2009).
- Pulicherla, N and Asokan, A, "Peptide affinity reagents for AAV capsid recognition and purification," *Gene Ther.*, 18:1020-1024 (2011).
- 65 Rabinowitz, JE et al., "Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity," *J. Virol.*, 76:791-801 (2002).

Raupp, C et al., "The threefold protrusions of adeno-associated virus type 8 are involved in cell surface targeting as well as postattachment processing," *J. Virol.*, 86:9396-9408 (2012).

Ryals, RC et al., "Quantifying transduction efficiencies of unmodified and tyrosine capsid mutant AAV vectors *in vitro* using two ocular cell lines," *Mol. Vis.*, 17:1090-1102 (2011).

5 Stieger, K et al., "Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain," *Mol. Ther.*, 16:916-923 (2008).

Summerford, C and Samulski, RJ, "Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions," *J. Virol.*, 72:1438-1445 (1988).

10 Tan, E et al., "Expression of cone-photoreceptor-specific antigens in a cell line derived from retinal tumors in transgenic mice," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 45:764-768 (2004).

Vandenberghe, LH et al., "Cone and rod transduction with alternative AAV serotypes in the macula of non-human primates," *Conference Proceedings, Assoc. Res. Vis. Ophthalmol.*, (ARVO), Ft. Lauderdale, FL. (2011).

Vandenberghe, LH et al., "Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey," *Sci. Transl. Med.*, 3:88ra54 (2011).

15 Weber, M et al., "Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery," *Mol. Ther.*, 7:774-781 (2003).

Wensel, TG et al., "Rhodopsin-EGFP knock-ins for imaging quantal gene alterations," *Vision Res.*, 45:3445-3453 (2005).

20 Wright, AF et al., "Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait," *Nat. Rev. Genet.*, 11:273-284 (2010).

Yang, GS et al., "Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size," *J. Virol.*, 76:7651-7660 (2002).

25 Yin, L et al., "Intravitreal injection of AAV2 transduces macaque inner retina," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 52:2775-2783 (2011).

Zhong, L et al., "Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105:7827-7832 (2008).

Zolotukhin, S et al., "Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors," *Methods*, 28:158-167 (2002).

30 La descripción en el presente documento de cualquier aspecto u opción de la divulgación usando términos tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos pretende proporcionar soporte para un aspecto u opción similar de la divulgación que "consiste en", "consiste esencialmente en" o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos particulares, a menos que se indique de otro modo o se contradiga claramente por el contexto (por ejemplo, una composición que se describe en el presente documento que comprende un elemento particular debe entenderse que también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se indique de otro modo o se contradiga claramente por el contexto).

#### LISTA DE SECUENCIAS

40 <110> University of Florida Research Foundation, Inc.

<120> VECTORES RAAV MEJORADOS Y MÉTODOS PARA LA TRANSDUCCIÓN DE FOTORRECEPTORES Y CÉLULA EPR

45 <130> UI197.70021WO00

<150> US 61/947940

50 <151> 04/03/2014

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

55 <210> 1

<211> 736

<212> PRT

<213> virus adenoasociado 1

60 <400> 1

ES 2 768 763 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 Asp 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 Lys 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 Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly  
 145 150 155 160

ES 2 768 763 T3

Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro  
 180 185 190  
 Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
 195 200 205  
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala  
 210 215 220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
 245 250 255  
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His  
 260 265 270  
 Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe  
 275 280 285  
 His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn  
 290 295 300  
 Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln  
 305 310 315 320  
 Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn  
 325 330 335  
 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro  
 340 345 350  
 Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala  
 355 360 365  
 Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly  
 370 375 380  
 Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro  
 385 390 395 400  
 Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe  
 405 410 415

ES 2 768 763 T3

Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp  
 420 425 430

Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg  
 435 440 445

Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser  
 450 455 460

Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro  
 465 470 475 480

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn  
 485 490 495

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

Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys  
 515 520 525

Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly  
 530 535 540

Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile  
 545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg  
 565 570 575

Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala  
 580 585 590

Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln  
 595 600 605

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

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

Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala  
 645 650 655

Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr  
 660 665 670

ES 2 768 763 T3

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

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

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

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

<210> 2  
<211> 735  
<212> PRT  
<213> virus adenoasociado 2

5

<400> 2

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

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

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser 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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
65 70 75 80

Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys 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 Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
130 135 140

Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly  
145 150 155 160



ES 2 768 763 T3

Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly  
 195 200 205  
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser  
 210 215 220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
 245 250 255  
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr  
 260 265 270  
 Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His  
 275 280 285  
 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp  
 290 295 300  
 Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu  
 325 330 335  
 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr  
 340 345 350  
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp  
 355 360 365  
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser  
 370 375 380  
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser  
 385 390 395 400  
 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu



ES 2 768 763 T3

Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln  
660 665 670

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

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

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

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

<210> 3  
<211> 736  
5 <212> PRT  
<213> virus adenoasociado 3  
  
<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 Val Pro Gln Pro  
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro  
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
50 55 60

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys 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 Ile Leu Glu Pro  
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Gly  
130 135 140

ES 2 768 763 T3

Ala Val Asp Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Val Gly  
145 150 155 160

Lys Ser Gly Lys Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
165 170 175

Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro  
180 185 190

Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Ser Asn Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser  
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr  
260 265 270

Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His  
275 280 285

Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp  
290 295 300

Gly Phe Arg Pro Lys Lys Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val  
305 310 315 320

Arg Gly Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu  
325 330 335

Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr  
340 345 350

Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp  
355 360 365

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser  
370 375 380

Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser  
385 390 395 400

ES 2 768 763 T3

Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Thr Phe Glu  
 405 410 415

Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg  
 420 425 430

Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr  
 435 440 445

Gln Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Asn Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser  
 450 455 460

Gln Ala Gly Pro Gln Ser Met Ser Leu Gln Ala Arg Asn Trp Leu Pro  
 465 470 475 480

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser Lys Thr Ala Asn Asp Asn  
 485 490 495

Asn Asn Ser Asn Phe Pro Trp Thr Ala Ala Ser Lys Tyr His Leu Asn  
 500 505 510

Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys  
 515 520 525

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

Lys Glu Gly Thr Thr Ala Ser Asn Ala Glu Leu Asp Asn Val Met Ile  
 545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln  
 565 570 575

Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gln Ser Ser Asn Thr Ala Pro Thr  
 580 585 590

Thr Gly Thr Val Asn His Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln  
 595 600 605

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

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

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Met Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala  
 645 650 655

ES 2 768 763 T3

Asn Pro Pro Thr Thr Phe Ser Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr  
660 665 670

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

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

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

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

<210> 4  
<211> 734  
<212> PRT  
<213> virus adenoasociado 4

5

<400> 4

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

Gly Val Arg Glu Trp Trp Ala Leu Gln Pro Gly Ala Pro Lys Pro Lys  
20 25 30

Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro Gly  
35 40 45

Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro Val  
50 55 60

Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp Gln  
65 70 75 80

Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala Asp  
85 90 95

Ala Glu Phe Gln Gln Arg Leu Gln Gly Asp Thr Ser Phe Gly Gly Asn  
100 105 110

Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro Leu  
115 120 125

Gly Leu Val Glu Gln Ala Gly Glu Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro  
130 135 140

ES 2 768 763 T3

Leu Ile Glu Ser Pro Gln Gln Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile Gly Lys  
 145 150 155 160

Lys Gly Lys Gln Pro Ala Lys Lys Lys Leu Val Phe Glu Asp Glu Thr  
 165 170 175

Gly Ala Gly Asp Gly Pro Pro Glu Gly Ser Thr Ser Gly Ala Met Ser  
 180 185 190

Asp Asp Ser Glu Met Arg Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Val Glu Gly  
 195 200 205

Gly Gln Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys  
 210 215 220

Asp Ser Thr Trp Ser Glu Gly His Val Thr Thr Thr Ser Thr Arg Thr  
 225 230 235 240

Trp Val Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Arg Leu Gly Glu  
 245 250 255

Ser Leu Gln Ser Asn Thr Tyr Asn Gly Phe Ser Thr Pro Trp Gly Tyr  
 260 265 270

Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln  
 275 280 285

Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Met Arg Pro Lys Ala Met Arg Val  
 290 295 300

Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Ser Asn Gly Glu  
 305 310 315 320

Thr Thr Val Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Ile Phe Ala Asp  
 325 330 335

Ser Ser Tyr Glu Leu Pro Tyr Val Met Asp Ala Gly Gln Glu Gly Ser  
 340 345 350

Leu Pro Pro Phe Pro Asn Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr  
 355 360 365

Cys Gly Leu Val Thr Gly Asn Thr Ser Gln Gln Gln Thr Asp Arg Asn  
 370 375 380

Ala Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly





ES 2 768 763 T3

Pro Pro Pro Gln Ile Phe Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro  
645 650 655

Ala Thr Thr Phe Ser Ser Thr Pro Val Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr  
660 665 670

Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Gln Ile Asp Trp Glu Ile Gln Lys Glu  
675 680 685

Arg Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Phe Thr Ser Asn Tyr Gly  
690 695 700

Gln Gln Asn Ser Leu Leu Trp Ala Pro Asp Ala Ala Gly Lys Tyr Thr  
705 710 715 720

Glu Pro Arg Ala Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr His His Leu  
725 730

<210> 5  
<211> 724  
<212> PRT  
<213> virus adenoasociado 5

5

<400> 5

Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu  
1 5 10 15

Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys  
20 25 30

Pro Asn Gln Gln His Gln Asp Gln Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro Gly  
35 40 45

Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg Gly Glu Pro Val  
50 55 60

Asn Arg Ala Asp Glu Val Ala Arg Glu His Asp Ile Ser Tyr Asn Glu  
65 70 75 80

Gln Leu Glu Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala Asp  
85 90 95

Ala Glu Phe Gln Glu Lys Leu Ala Asp Asp Thr Ser Phe Gly Gly Asn  
100 105 110

Leu Gly Lys Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro Phe  
115 120 125

ES 2 768 763 T3

Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Thr Gly Lys Arg Ile  
130 135 140

Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser  
145 150 155 160

Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser Gln  
165 170 175

Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp Thr  
180 185 190

Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala  
195 200 205

Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp  
210 215 220

Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro  
225 230 235 240

Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp  
245 250 255

Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr  
260 265 270

Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln  
275 280 285

Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val  
290 295 300

Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr  
305 310 315 320

Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp  
325 330 335

Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys  
340 345 350

Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr  
355 360 365

Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser  
370 375 380

ES 2 768 763 T3

Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn  
 385 390 395 400  
 Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser  
 405 410 415  
 Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp  
 420 425 430  
 Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln  
 435 440 445  
 Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp  
 450 455 460  
 Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly  
 465 470 475 480  
 Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu  
 485 490 495  
 Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr  
 500 505 510  
 Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile  
 515 520 525  
 Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu  
 530 535 540  
 Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg  
 545 550 555 560  
 Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser  
 565 570 575  
 Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro  
 580 585 590  
 Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp  
 595 600 605  
 Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met  
 610 615 620  
 Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn  
 625 630 635 640

ES 2 768 763 T3

Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr Ser Phe Ser Asp Val Pro Val Ser  
645 650 655

Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Thr Val Glu Met Glu  
660 665 670

Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln  
675 680 685

Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Val Asp Phe Ala Pro Asp  
690 695 700

Ser Thr Gly Glu Tyr Arg Thr Thr Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu  
705 710 715 720

Thr Arg Pro Leu

<210> 6  
<211> 736  
<212> PRT  
<213> virus adenoasociado 6

5

<400> 6

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 Asp 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 Lys 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

ES 2 768 763 T3

Phe Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
 130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly  
 145 150 155 160

Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175

Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro  
 180 185 190

Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
 195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala  
 210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
 225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
 245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His  
 260 265 270

Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe  
 275 280 285

His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn  
 290 295 300

Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln  
 305 310 315 320

Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn  
 325 330 335

Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro  
 340 345 350

Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala  
 355 360 365

Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly



ES 2 768 763 T3

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

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

Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr  
660 665 670

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

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

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

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

<210> 7  
<211> 737  
<212> PRT  
<213> virus adenoasociado 7

5

<400> 7

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 Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asn 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 Lys 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

ES 2 768 763 T3

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 Ala 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 Ser Val Gly Ser Gly Thr Val Ala Ala Gly Gly  
 195 200 205

Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn  
 210 215 220

Ala 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 Ser Glu Thr Ala Gly Ser Thr Asn Asp Asn  
 260 265 270

Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg  
 275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn  
 290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Lys Leu Arg Phe Lys Leu Phe Asn Ile  
 305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn  
 325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu  
 340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro  
 355 360 365



ES 2 768 763 T3

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn  
 370 375 380

Gly Ser Gln Ser Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe  
 385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr Ser  
 405 410 415

Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu  
 420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ala  
 435 440 445

Arg Thr Gln Ser Asn Pro Gly Gly Thr Ala Gly Asn Arg Glu Leu Gln  
 450 455 460

Phe Tyr Gln Gly Gly Pro Ser Thr Met Ala Glu Gln Ala Lys Asn Trp  
 465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Phe Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Leu Asp  
 485 490 495

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

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

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

Phe Gly Lys Thr Gly Ala Thr Asn Lys Thr Thr Leu Glu Asn Val Leu  
 545 550 555 560

Met Thr Asn Glu Glu Glu Ile Arg Pro Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu  
 565 570 575

Glu Tyr Gly Ile Val Ser Ser Asn Leu Gln Ala Ala Asn Thr Ala Ala  
 580 585 590

Gln Thr Gln Val Val Asn Asn Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp  
 595 600 605

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

ES 2 768 763 T3

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

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

Ala Asn Pro Pro Glu Val Phe Thr Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile  
660 665 670

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

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

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

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

Leu

<210> 8  
<211> 738  
5 <212> PRT  
<213> virus adenoasociado 8

<220>  
10 <221> misc\_feature  
<222> (566)..(566)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 8

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

ES 2 768 763 T3

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  
 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

ES 2 768 763 T3

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  
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 Xaa Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr  
565 570 575

ES 2 768 763 T3

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  
625 630 635 640

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> 9  
<211> 736  
<212> PRT  
<213> virus adenoasociado 9

5

<400> 9

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 Gln Pro  
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro  
35 40 45

ES 2 768 763 T3

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly 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 Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro  
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly  
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro  
180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser  
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn  
260 265 270

Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg  
275 280 285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn

ES 2 768 763 T3

290						295										300
Asn	Trp	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile	
305					310					315					320	
Gln	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Asp	Asn	Asn	Gly	Val	Lys	Thr	Ile	Ala	Asn	
				325					330					335		
Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Asp	Tyr	Gln	Leu	
			340					345					350			
Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Glu	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro	
		355					360					365				
Ala	Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp	
	370					375					380					
Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe	
385					390					395					400	
Pro	Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Phe	Ser	Tyr	Glu	
			405						410					415		
Phe	Glu	Asn	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	
			420					425					430			
Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser	
		435					440					445				
Lys	Thr	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Gln	Asn	Gln	Gln	Thr	Leu	Lys	Phe	Ser	
	450					455					460					
Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Asn	Met	Ala	Val	Gln	Gly	Arg	Asn	Tyr	Ile	Pro	
465					470					475					480	
Gly	Pro	Ser	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Asn	
				485					490					495		
Asn	Asn	Ser	Glu	Phe	Ala	Trp	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Ala	Leu	Asn	
			500					505					510			
Gly	Arg	Asn	Ser	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys	
		515					520					525				
Glu	Gly	Glu	Asp	Arg	Phe	Phe	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Phe	Gly	
	530					535					540					

ES 2 768 763 T3

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile  
545 550 555 560

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

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln  
580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln  
595 600 605

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 10  
<211> 738  
5 <212> PRT  
<213> virus adenoasociado 10

<400> 10

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 Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
20 25 30



ES 2 768 763 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 Lys 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 Ala 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 Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln  
 165 170 175  
 Thr Gly Glu Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro  
 180 185 190  
 Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly 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 Ser 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 2 768 763 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 Glu Phe Ser 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 Ser Thr Gly Gly Thr Gln Gly Thr Gln Gln Leu Leu  
 450 455 460  
 Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ala Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp  
 465 470 475 480  
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser  
 485 490 495  
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His  
 500 505 510  
 Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr  
 515 520 525  
 His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met  
 530 535 540

ES 2 768 763 T3

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser 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 Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Ala Asn Thr Gly  
 580 585 590

Pro Ile Val Gly Asn 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 Ser Gln Ala Lys Leu Ala 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 Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu  
 705 710 715 720

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

Asn Leu

## REIVINDICACIONES

1. Una partícula viral recombinante adenoasociada (rAAV) que comprende:

5 una proteína de la cápside modificada, en donde la proteína de la cápside modificada comprende una o más sustituciones de aminoácidos no nativos en las posiciones correspondientes a uno o más residuos de aminoácidos expuestos a la superficie de unión a sulfato de heparina de una proteína de la cápside de AAV2 de tipo silvestre como se expone en la SEQ ID NO: 2; o a residuos de aminoácidos correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9 o AAV10, como se expone, respectivamente, en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, en donde las sustituciones de aminoácidos no nativos tienen lugar en los residuos de aminoácidos:

- 15 (a) Y444, T491, Y500, R585, R588, R487 e Y730;  
 (b) Y444, T491, Y500, R585 e Y730;  
 (c) Y444, T491, Y500, R588 e Y730;  
 (d) Y444, T491, Y500, R585, R588 e Y730;  
 (e) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588, R487 e Y730;  
 (f) Y444, T491, Y500, E530, R585 e Y730;  
 (g) Y444, T491, Y500, E530, R588 e Y730; o  
 20 (h) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588 e Y730

de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o en las posiciones de aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9 o AAV10, como se expone, respectivamente, en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10.

2. Un vector de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside modificada, en donde la proteína de la cápside modificada comprende una o más sustituciones de aminoácidos no nativos en las posiciones correspondientes a uno o más residuos de aminoácidos expuestos a la superficie de unión a sulfato de heparina de una proteína de la cápside de AAV2 de tipo silvestre como se expone en la SEQ ID NO: 2; o a residuos de aminoácidos correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9 o AAV10, como se expone, respectivamente, en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10, en donde las sustituciones de aminoácidos no nativos tienen lugar en los residuos de aminoácidos:

- 30 (a) Y444, T491, Y500, R585, R588, R487 e Y730;  
 (b) Y444, T491, Y500, R585 e Y730;  
 (c) Y444, T491, Y500, R588 e Y730;  
 40 (d) Y444, T491, Y500, R585, R588 e Y730;  
 (e) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588, R487 e Y730;  
 (f) Y444, T491, Y500, E530, R585 e Y730;  
 (g) Y444, T491, Y500, E530, R588 e Y730; o  
 45 (h) Y444, T491, Y500, E530, R585, R588 e Y730

de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o en las posiciones de aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9 o AAV10, como se expone, respectivamente, en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10.

3. La partícula de rAAV de la reivindicación 1 o el vector de ácido nucleico de la reivindicación 2, en donde la proteína de la cápside modificada comprende además una o más sustituciones de aminoácidos no nativos en las posiciones correspondientes a uno o más residuos de tirosina y/o treonina expuestos a la superficie de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2; o a residuos de tirosina correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9 o AAV10, como se expone, respectivamente, en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10.

4. La partícula de rAAV de las reivindicaciones 1 o 3, o el vector de ácido nucleico de las reivindicaciones 2 o 3, en donde las sustituciones de aminoácidos no nativos comprenden:

- 60 (a) Y444F, T491V, Y500F, R585S, R588T, R487G e Y730F;  
 (b) Y444F, T491V, Y500F, R585S e Y730F;  
 65 (c) Y444F, T491V, Y500F, R588T e Y730F;  
 (d) Y444F, T491V, Y500F, R585S, R588T e Y730F;

- (e) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, R588T, R487G e Y730F;
- (f) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S e Y730F;
- (g) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R588T e Y730F; o
- (h) Y444F, T491V, Y500F, E530K, R585S, R588T e Y730F

5 de la proteína de la cápside de tipo silvestre de AAV2 como se expone en la SEQ ID NO: 2, o en las posiciones de aminoácidos equivalentes correspondientes a las mismas en una cualquiera de las proteínas de la cápside de tipo silvestre de AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, o AAV10, como se expone, respectivamente, en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, o SEQ ID NO: 10.

15 5. La partícula de rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, o 4, o el vector de ácido nucleico de las reivindicaciones 2 a 5, en donde la eficiencia de transducción de la partícula es de 2 a 50 veces mayor en el uno o más fotorreceptores (PR) o células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) que la de una partícula que comprende una proteína de la cápside de tipo silvestre no modificada correspondiente.

20 6. La partícula de rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 5, en donde la partícula comprende un polinucleótido que comprende un segmento de ácido nucleico que codifica una molécula de diagnóstico o terapéutica unida operativamente a un promotor que es capaz de expresar el segmento de ácido nucleico en una o más células fotorreceptoras o del epitelio pigmentario de la retina de un ojo de mamífero; opcionalmente en la que el segmento de ácido nucleico comprende además un potenciador, una secuencia reguladora postranscripcional, una señal de poliadenilación, o cualquier combinación de los mismos, unidos operativamente al segmento de ácido nucleico que codifica el agente terapéutico.

25 7. La partícula de rAAV de la reivindicación 6, en la que el segmento de ácido nucleico se expresa o se codifica en una o más células fotorreceptoras o células EPR de un ojo de mamífero, un polipéptido, un péptido, una ribozima, un ácido nucleico peptídico, un ARNip, un ARNi, un oligonucleótido antisentido, un polinucleótido antisentido, un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno o cualquier combinación de los mismos.

30 8. Una partícula de rAAV para su uso en medicina, en donde la partícula de rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 7 se usa para transducir una célula fotorreceptora o una célula del epitelio pigmentario de la retina de mamífero, en la que la partícula de rAAV se administra a uno o ambos ojos del mamífero; opcionalmente en la que la partícula de rAAV se administra por vía intravítrea o subretiniana.

35 9. Una partícula de rAAV para su uso al proporcionar a un mamífero que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente terapéutico seleccionado, en donde una cantidad de la partícula de rAAV de las reivindicaciones 6 o 7 se administra a uno o ambos ojos del mamífero; y durante un tiempo eficaz para proporcionar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico seleccionado; opcionalmente en donde la partícula de rAAV se administra por vía intravítrea o subretiniana.

40 10. Una partícula de rAAV para su uso en el tratamiento o mejora de uno o más síntomas de una enfermedad, un trastorno, una disfunción, una lesión, una afección anormal o un traumatismo en un mamífero, en donde la partícula de rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 7 se administra por vía intravítrea o subretiniana a uno o ambos ojos del mamífero que lo necesita, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para tratar o mejorar el uno o más síntomas de la enfermedad, el trastorno, la disfunción, la lesión, la afección anormal o el traumatismo en el mamífero.

50 11. Una partícula de rAAV para su uso en medicina, en donde la partícula de rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 7 se administra: por vía subretiniana o intravítrea a uno o ambos ojos del mamífero, en donde la partícula de rAAV comprende un polinucleótido que comprende al menos un primer polinucleótido que comprende un promotor específico de células PR o EPR unido operativamente al menos a un primer segmento de ácido nucleico que codifica un agente terapéutico, durante un tiempo eficaz para expresar el agente terapéutico en una o más células PR o células RPE del mamífero; opcionalmente en donde el mamífero es humano; y además, opcionalmente, el ser humano es un neonato, un recién nacido, un bebé o un joven.

55 12. La partícula de rAAV de la reivindicación 11, en donde cuando el mamífero es humano, el ser humano tiene, se sospecha que tiene, está en riesgo de desarrollar o ha sido diagnosticado con un trastorno de la retina, una enfermedad de la retina, una distrofia de la retina o cualquier combinación de los mismos; opcionalmente en donde el trastorno de la retina, la enfermedad de la retina o la distrofia de la retina son hereditarias.

60 13. La partícula de rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, en donde la producción del agente terapéutico a) conserva una o más células fotorreceptoras o una o más células EPR, b) restaura una o más funciones mediadas por bastones y/o conos, c) restaura el comportamiento visual en uno o ambos ojos o d) cualquier combinación de los mismos.

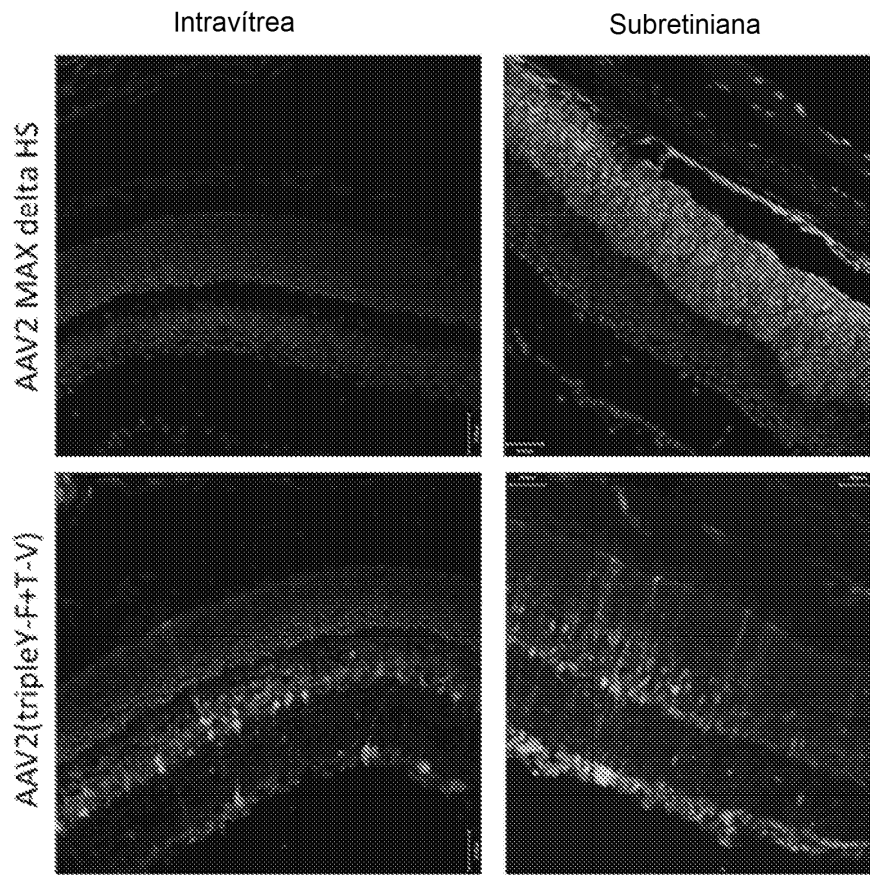
65 14. La partícula de rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde la producción del agente

terapéutico persiste en una o más células fotorreceptoras o en una o más células EPR sustancialmente durante un periodo de al menos tres meses después de una administración inicial de la partícula de rAAV en el uno o ambos ojos del mamífero; opcionalmente en donde la producción del agente terapéutico persiste en la una o más células retinianas sustancialmente durante un periodo de al menos seis meses después de una administración inicial de la partícula de rAAV en uno o ambos ojos del mamífero.

- 5
- 10
- 15
15. La partícula de rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en la que el agente terapéutico es un agonista, un antagonista, un factor antiapoptosis, un inhibidor, un receptor, una citocina, una citotoxina, un agente eritropoyético, una glucoproteína, un factor de crecimiento, un receptor del factor de crecimiento, una hormona, un receptor hormonal, un interferón, una interleucina, un receptor de interleucina, un factor de crecimiento nervioso, un péptido neuroactivo, un receptor de péptido neuroactivo, una proteasa, un inhibidor de proteasa, una proteína descarboxilasa, una proteína cinasa, un inhibidor de proteína cinasa, una enzima, una proteína de unión al receptor, una proteína de transporte o un inhibidor de la misma, un receptor de serotonina, o un inhibidor de captación de la misma, una serpina, un receptor de serpina, un supresor tumoral, un quimioterapéutico, o cualquier combinación de los mismos.

**FIG. 1A**

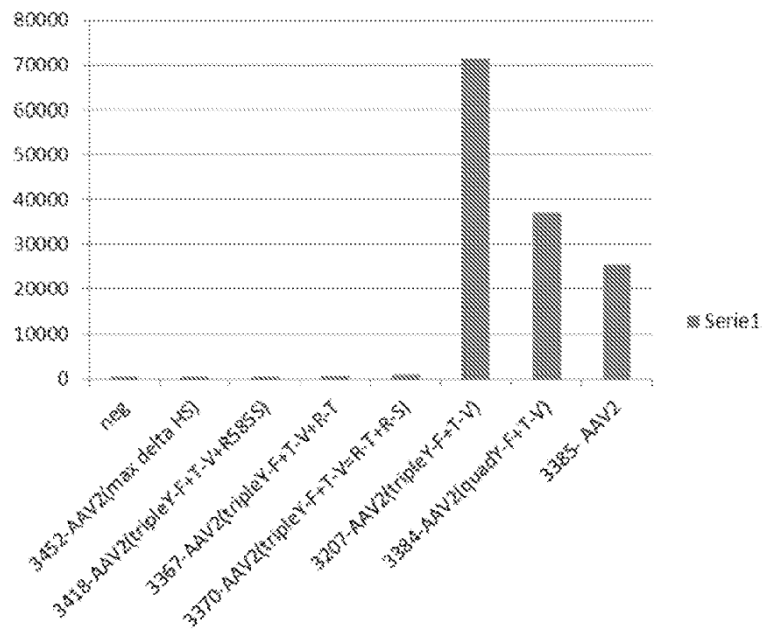
**FIG. 1B**



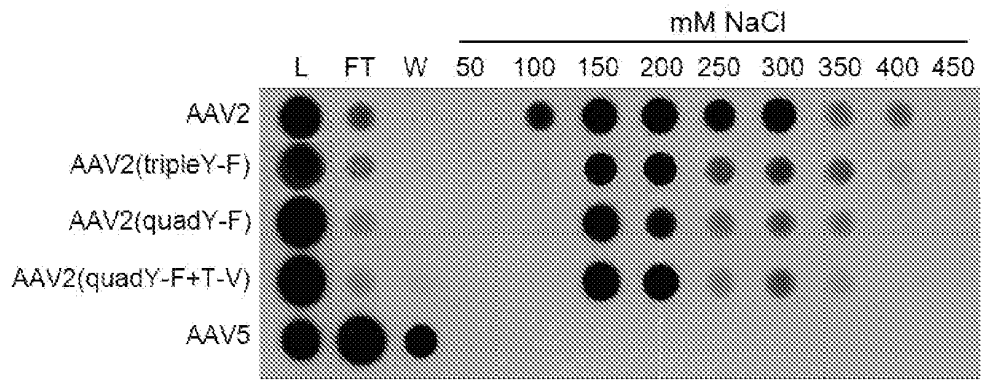
**FIG. 1C**

**FIG. 1D**

FIG. 2







**FIG. 3**