

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 879 636**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/71 (2006.01) **A61P 25/28** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) **A61P 27/06** (2006.01)
C07K 14/015 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) **A61P 43/00** (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01)
A61P 25/16 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2015 PCT/US2015/028966**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2015 WO15168666**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2015 E 15723386 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **05.03.2025 EP 3137497**

(54) Título: **Vectores AAV para la terapia génica de la retina y el SNC**

(30) Prioridad:

02.05.2014 US 201461988131 P
10.02.2015 US 201562114575 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente modificada:
13.06.2025

(73) Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.00%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

(72) Inventor/es:

SCARIA, ABRAHAM;
SULLIVAN, JENNIFER;
STANEK, LISA, M. y
SHIHABUDDIN, LAMYA

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

DESCRIPCIÓN

Vectores AAV para la terapia génica de la retina y el SNC

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de EE.UU. N° de Serie 61/988.131, presentada el 2 de mayo de 2014, y la Solicitud Provisional de EE.UU. N° de Serie 62/114.575, presentada el 10 de febrero de 2015.

10 PRESENTACIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS EN ARCHIVO DE TEXTO ASCII

El contenido de la siguiente presentación en un archivo de texto ASCII se incorpora en esta memoria como referencia en su totalidad: un formulario legible por computadora (CRF) del Listado de Secuencias (nombre de archivo: 159792010440SEQLIST.txt, fecha de registro: 29 de abril de 2015, tamaño: 85 KB).

15 CAMPO DE LA INVENCIÓN

20 La presente invención se refiere a vectores virales adeno-asociados recombinantes (rAAV) variantes para un suministro mejorado a los ojos; por ejemplo, para una terapia génica mejorada de la retina.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCIÓN

25 Las enfermedades degenerativas de la retina son un enfoque prometedor para la terapia génica mediada por vectores adeno-asociados (AAV). Los vectores AAV pueden mediar en la expresión génica a largo plazo en la retina y provocar respuestas inmunitarias mínimas, lo que hace que estos vectores sean una elección atractiva para el suministro de genes a los ojos. La retina es un tejido sensible a la luz en la parte posterior del ojo que se compone de una diversidad de tipos de células, incluyendo células fotorreceptoras, células epiteliales pigmentadas de la retina y células ganglionares de la retina. El tipo de célula diana y la ruta de suministro del vector para el vector de terapia génica de AAV dependerá de la indicación de la enfermedad. Por ejemplo, un ensayo clínico de Fase I para la degeneración macular relacionada con la edad emplea un suministro intravítreo de vector para lograr la transducción de las células ganglionares de la retina y un ensayo clínico reciente para el tratamiento de pacientes con amaurosis congénita de Leber tipo 2, una forma de retinitis pigmentosa, utiliza un suministro subretiniano del gen RPE65 para transducir las células epiteliales pigmentadas de la retina.

35 Allocat et al. (2007, J. Virology 81:11372-11380) informa sobre la transducción de fotorreceptores murinos con serotipos de AAV.

40 A la vista de una utilidad de este tipo, existe la necesidad de desarrollar agentes y métodos novedosos para mejorar el suministro de AAV a los ojos.

En la invención, el trastorno es un trastorno ocular y la administración es a la subretina, y la partícula de rAAV comprende una cápside de rAAV2 según se define en las reivindicaciones.

45 Los vectores basados en virus adeno-asociados (AAV) también se han convertido en el sistema de vectores preferido para la terapia génica neurológica, con un excelente historial de seguridad en múltiples ensayos clínicos (Kaplitt, M.G. et al. (2007) Lancet 369:2097-2105; Eberling, J.L. et al. (2008) Neurology 70:1980-1983; Fiandaca, M.S. et al. (2009) Neuroimage. 47 Supl 2: T 27-35). Sin embargo, el tratamiento eficaz de los trastornos neurológicos se ha visto obstaculizado en gran medida por los problemas asociados con el suministro de vectores AAV a las poblaciones de células afectadas. Este problema de suministro ha sido especialmente problemático para los trastornos que implican el sistema nervioso central (SNC). Por consiguiente, existe una necesidad adicional de mejorar el suministro de AAV al SNC.

50 En base a la descripción que está contenida en esta memoria, la presente invención proporciona una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) para uso en un método de tratar un trastorno ocular en un mamífero, comprendiendo dicho método suministrar un ácido nucleico heterólogo al ojo de un individuo, en donde dicho método comprende administrar dicha partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) a la subretina del individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de AAV2 recombinante (rAAV2) que comprende proteínas de la cápside de AAV2 que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más de las posiciones R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, en donde la una o más sustituciones de aminoácidos es con un residuo de aminoácido hidrófobo, y en donde la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV a un proteoglicano de heparán sulfato, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV.

60 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) para uso en un método para tratar un trastorno ocular en un individuo, en donde dicho método comprende el suministro subretiniano de dicha composición a la retina del individuo, en donde las partículas

de rAAV comprenden a) una cápside de rAAV2 que comprende proteínas de la cápside de AAV2 que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más de las posiciones R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, en donde la una o más sustituciones de aminoácidos es con un residuo de aminoácido hidrófobo, y en donde la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV a un proteoglicano de heparán sulfato y b) un vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV.

La presente invención, otros aspectos de la misma y algunas realizaciones preferidas de la misma se recogen en las reivindicaciones adjuntas.

En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para suministrar un ácido nucleico heterólogo al ojo de un individuo, que comprenden administrar una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) a la subretina del individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV. En la invención, la partícula rAAV comprende una cápside de serotipo 2 de AAV (AAV2). En la invención, la una o más sustituciones de aminoácidos reducen la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos aumentan la eficacia de transducción por la partícula de rAAV de una célula en el ojo o el SNC. En algunas realizaciones, la sustitución de uno o más aminoácidos aumenta la eficiencia de la transducción por la partícula de rAAV de una célula en el ojo o el SNC en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%, p. ej., en comparación con una cápside de rAAV de referencia que comprende una proteína de la cápside de AAV de tipo salvaje. En algunas realizaciones, la célula del ojo es una célula de la retina, una célula fotorreceptora, células epiteliales pigmentadas de la retina, células bipolares, células horizontales, células amacrinas, células de Müller y/o células ganglionares. En algunos casos, la célula del SNC es un oligodendrocito, astrocito, neurona, célula del parénquima cerebral, célula microglial, célula ependemal y/o una célula de Purkinje.

En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside con una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la numeración se basa en la VP1 de AAV2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En realizaciones adicionales, una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En aún otras realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina por un residuo de alanina. En la invención, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOS: 2, 4 y/o 6. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende una sustitución en la posición R532. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones en la posición R484 y R487 o en las posiciones R585 y R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones de R484A y R487A o sustituciones de R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En realizaciones adicionales, la cápside de AAV comprende sustituciones de aminoácidos R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV-2. En la invención, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV2.

. En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside con una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 485, 488, 528, 533, 586 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside con una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 485, 488, 528 o 533, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAVrh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En otros casos, la una o más sustituciones de aminoácidos

- comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En algunos casos, un residuo de aminoácido hidrófobo se sustituye con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En casos adicionales, la sustitución de uno o más aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de alanina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos está en la posición 485, 488, 528, 533 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside con una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 485, 488, 528 o 533, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAVrh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.
- 5 En algunos casos, la sustitución de aminoácidos comprende una sustitución en la posición R485, R488, R533 o T589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV de SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la sustitución de un aminoácido comprende una sustitución R533A, numeración basada en VP1 de AAVrh8R.
- 10 En algunos casos, la sustitución de aminoácidos comprende una sustitución en la posición R485, R488, R533 o T589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV de SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la sustitución de un aminoácido comprende una sustitución R533A, numeración basada en VP1 de AAVrh8R.
- 15 En algunos casos, la sustitución de aminoácidos comprende una sustitución en la posición R485, R488, R533 o T589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV de SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la sustitución de un aminoácido comprende una sustitución R533A, numeración basada en VP1 de AAVrh8R.
- 20 En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV1, AAV6 o AAV9 y en donde la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 485, 488, 528, 533, 586 y/o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAV1, AAV6 o AAV9; y/o en donde la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV8 o AAVrh10 y en donde la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 487, 490, 535, 588 y/o 591, numeración basada en la numeración VP1 de AAV8 o AAVrh10.
- 25 En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a HSPG (*p. ej.*, reduce o elimina la unión a HSPG) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2 y un vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un antioxidante, un factor neurotrófico, un factor anti-apoptótico, un factor anti-angiogénico y un factor antiinflamatorio. En realizaciones adicionales, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: Prph2, RPE65, AIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, Clarina, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3, 35 GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NPkB, Endostatina, Angiostatina, sFlt, SPDGF-R, IL10, anti-IL17, sIL17R, IL1-*ra*, anti-TGFβ, sTNF-R I, sTNF-R II e IL4. En otras realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un ácido nucleico terapéutico. En realizaciones adicionales, el ácido nucleico terapéutico es un ARNip, un ARNi, un miARN, un ARN antisentido, una ribozima o una ADNzima. En algunas realizaciones, el vector rAAV es un vector rAAV auto-complementario.
- 40 En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a HSPG (*p. ej.*, reduce o elimina la unión a HSPG) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2 y un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico, en donde el ácido nucleico heterólogo está bajo el control de una secuencia de promotor que se expresa en la retina. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo está enlazado operativamente a un promotor adecuado para la expresión del polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico en uno o más tipos de células de la retina. En algunas realizaciones, la célula de la retina es una célula fotorreceptora, células epiteliales pigmentadas de la retina, células bipolares, células horizontales, células amacrinas, células de Müller y/o células ganglionares. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de rodopsina quinasa (RK), un promotor de opsina, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de β-actina de pollo (CBA).
- 45 En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a HSPG (*p. ej.*, reduce o elimina la unión a HSPG) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2 y un ácido nucleico heterólogo para el suministro del ácido nucleico heterólogo a la retina de un individuo. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo se utiliza para tratar un trastorno ocular seleccionado del grupo que consiste en: degeneración retiniana autosómica recesiva grave de inicio temprano (amaurosis congénita de Leber), acromatopsia congénita, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Best, enfermedad de Doyne, distrofia de conos, retinitis pigmentosa, retinosquisis ligada al cromosoma X, síndrome de Usher, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular atrófica relacionada con la edad, AMD neovascular, maculopatía diabética, retinopatía diabética proliferativa (PDR), edema macular cistoide, retinopatía serosa central, desprendimiento de retina, inflamación intraocular, glaucoma y uveítis posterior.
- 50 En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación proporciona métodos para mejorar la transducción de células de rAAV después del suministro subretiniano de una partícula de rAAV al ojo de un individuo en comparación con la transducción de células
- 55 En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a HSPG (*p. ej.*, reduce o elimina la unión a HSPG) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2 y un ácido nucleico heterólogo para el suministro del ácido nucleico heterólogo a la retina de un individuo. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo se utiliza para tratar un trastorno ocular seleccionado del grupo que consiste en: degeneración retiniana autosómica recesiva grave de inicio temprano (amaurosis congénita de Leber), acromatopsia congénita, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Best, enfermedad de Doyne, distrofia de conos, retinitis pigmentosa, retinosquisis ligada al cromosoma X, síndrome de Usher, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular atrófica relacionada con la edad, AMD neovascular, maculopatía diabética, retinopatía diabética proliferativa (PDR), edema macular cistoide, retinopatía serosa central, desprendimiento de retina, inflamación intraocular, glaucoma y uveítis posterior.
- 60 En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación proporciona métodos para mejorar la transducción de células de rAAV después del suministro subretiniano de una partícula de rAAV al ojo de un individuo en comparación con la transducción de células
- 65 En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para mejorar la transducción de células de rAAV después del suministro subretiniano de una partícula de rAAV al ojo de un individuo en comparación con la transducción de células

con un rAAV que comprende una cápside de tipo salvaje, comprendiendo el método incorporar una o más sustituciones de aminoácidos en una proteína de la cápside de AAV en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2; en donde la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV y un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV.

En otros casos, la divulgación proporciona métodos para mejorar la expresión de un ácido nucleico heterólogo después del suministro subretiniano de partículas de rAAV al ojo de un individuo, comprendiendo el método incorporar una o más sustituciones de aminoácidos en una proteína de la cápside de AAV en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2; en donde la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV y un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV.

En la invención, las partículas de rAAV con transducción mejorada y/o expresión mejorada de un ácido nucleico heterólogo comprenden una cápside de serotipo 2 de AAV (AAV2). En la invención, la una o más sustituciones de aminoácidos reducen la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%.

En algunos casos, las partículas de rAAV con transducción mejorada y/o expresión mejorada de un ácido nucleico heterólogo comprenden la cápside con una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la numeración se basa en la VP1 de AAV2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En realizaciones adicionales, una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En aún otras realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina por un residuo de alanina. En la invención, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOS: 2, 4 y/o 6. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones en la posición R484 y R487 o en las posiciones R585 y R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones de R484A y R487A o sustituciones de R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En realizaciones adicionales, la cápside de AAV comprende sustituciones de aminoácidos R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV-2. En la invención, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV2.

En algunos casos, las partículas de rAAV con transducción mejorada y/o expresión mejorada de un ácido nucleico heterólogo comprenden la cápside con una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 485, 488, 528, 533, 586 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AA VRh8R. En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside con una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 485, 488, 528 o 533, numeración basada en la numeración VP1 de AA VRh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AA VRh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En otros casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En algunos casos, un residuo de aminoácido hidrófobo se sustituye con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En casos adicionales, la sustitución de uno o más aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de alanina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de alanina con un residuo de arginina o lisina. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos está en la posición 485, 488, 528, 533 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AA VRh8R. En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside con una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 485, 488, 528 o 533, numeración basada en la numeración VP1 de AA VRh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AA VRh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos comprende una sustitución en la posición R485, R488, R533 o T589, numeración basada en la

5 numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV de SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la sustitución de un aminoácido comprende una sustitución R533A, numeración basada en VP1 de AAVrh8R.

10 En algunos casos, las partículas de rAAV con transducción mejorada y/o expresión mejorada de un ácido nucleico heterólogo comprenden una cápside que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a HSPG (*p. ej.*, reduce o elimina la unión a HSPG) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2 y un vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un antioxidante, un factor neurotrófico, un factor anti-apoptótico, un factor anti-angiogénico y un factor antiinflamatorio. En realizaciones adicionales, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: Prph2, RPE65, AIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, Clarina, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPRGIP, CNGA3, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NPkB, Endostatina, Angiostatina, sFlt, sPDGF-R, IL10, anti-IL17, sIL17R, IL1-*ra*, anti-TGFβ, sTNF-R I, sTNF-R II e IL4. En otras realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un ácido nucleico terapéutico. En realizaciones adicionales, el ácido nucleico terapéutico es un ARNip, un ARNh, un ARNi, un miARN, un ARN antisentido, una ribozima o una ADNzima. En algunas realizaciones, el vector rAAV es un vector rAAV auto-complementario.

15 20 En algunos casos, las partículas de rAAV con transducción mejorada y/o expresión mejorada de un ácido nucleico heterólogo comprenden una cápside que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a HSPG (*p. ej.*, reduce o elimina la unión a HSPG) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2 y un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico, en donde el ácido nucleico heterólogo está bajo el control de una secuencia de promotor que se expresa en la retina. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo está enlazado operativamente a un promotor adecuado para la expresión del polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico en uno o más tipos de células de la retina. En algunas realizaciones, la célula de la retina es una célula fotorreceptora, una célula epitelial pigmentada de la retina y/o una célula ganglionar. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de rodopsina quinasa (RK), un promotor de opsina, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de β-actina de pollo (CBA).

25 30 35 En algunos casos, las partículas de rAAV con transducción mejorada y/o expresión mejorada de un ácido nucleico heterólogo comprenden una cápside que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a HSPG (*p. ej.*, reduce o elimina la unión a HSPG) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2 y un ácido nucleico heterólogo para el suministro del ácido nucleico heterólogo a la retina de un individuo. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo se utiliza para tratar un trastorno ocular seleccionado del grupo que consiste en: degeneración retiniana autosómica recesiva grave de inicio temprano (amaurosis congénita de Leber), acromatopsia congénita, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Best, enfermedad de Doyne, distrofia de conos, retinitis pigmentosa, retinosquisis ligada al cromosoma X, síndrome de Usher, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular atrófica relacionada con la edad, AMD neovascular, maculopatía diabética, retinopatía diabética proliferativa (PDR), edema macular cistoide, retinopatía serosa central, desprendimiento de retina, inflamación intraocular, glaucoma y uveítis posterior.

40 45 50 55 60 En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para tratar un trastorno ocular en un individuo (*p. ej.*, un ser humano) que comprenden el suministro de una composición que comprende partículas de rAAV a la retina de un individuo, en donde las partículas de rAAV comprenden a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV. En la invención, la partícula rAAV comprende una cápside de serotipo 2 de AAV (AAV2). En la invención, la una o más sustituciones de aminoácidos reducen la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%.

65 En algunos casos, los métodos comprenden el suministro subretiniano de partículas de rAAV que comprenden un vector rAAV que codifica un ácido nucleico heterólogo utilizado en el tratamiento del trastorno ocular en un individuo (*p. ej.*, un ser humano), en donde las partículas de rAAV comprenden una cápside con una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la numeración se basa en la VP1 de AAV2 que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En realizaciones adicionales, una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En aún otras realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina por un residuo de alanina. En la invención, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOs: 2, 4 y/o 6. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones en la posición R484 y R487 o en las posiciones R585 y R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones de R484A y R487A o sustituciones de R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En realizaciones adicionales, la cápside de AAV comprende sustituciones de aminoácidos R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV-2. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV1, una cápside de AAV2, una cápside de AAV3, una cápside de AAV6, una cápside de AAV8, una cápside de AAVrh8R, una cápside de AAV9 o una cápside de AAVrh10.

En algunos casos, los métodos comprenden el suministro subretiniano de partículas de rAAV que comprenden un vector de rAAV que codifica un ácido nucleico heterólogo utilizado en el tratamiento del trastorno ocular en un individuo (p. ej., un ser humano), en donde las partículas de rAAV comprenden una cápside con una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 485, 488, 528, 533, 586 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside con una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 485, 488, 528 o 533, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAVrh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En otros casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En algunos casos, un residuo de aminoácido hidrófobo se sustituye con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En casos adicionales, la sustitución de uno o más aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de alanina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de alanina con un residuo de arginina o lisina. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos está en la posición 485, 488, 528, 533 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside con una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 485, 488, 528 o 533, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAVrh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos comprende una sustitución en la posición R485, R488, R533 o T589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV de SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la sustitución de un aminoácido comprende una sustitución R533A, numeración basada en VP1 de AAVrh8R.

En algunos casos, los métodos comprenden el suministro subretiniano de partículas de rAAV que comprenden un vector rAAV que codifica un ácido nucleico heterólogo utilizado en el tratamiento del trastorno ocular en un individuo (p. ej., un ser humano), y una cápside que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran unión a HSPG (p. ej., reduce o elimina la unión a HSPG) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un antioxidante, un factor neurotrófico, un factor anti-apoptótico, un factor anti-angiogénico y un factor antiinflamatorio. En realizaciones adicionales, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: Prph2, RPE65, AIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, Clarina, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NPkB, Endostatina, Angiostatina, sFlt, sPDGF-R, IL10, anti-IL17, sIL17R, IL1-*ra*, anti-TGFβ, sTNF-R I, sTNF-R II e IL4. En otras realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un ácido nucleico terapéutico. En realizaciones adicionales, el ácido nucleico terapéutico es un ARNip, un ARNh, un ARNi, un miARN, un ARN antisentido, una ribozima o una ADNzima. En algunas realizaciones, el vector rAAV es un vector rAAV auto-complementario.

En algunos casos, los métodos comprenden el suministro subretiniano de partículas de rAAV que comprenden un vector rAAV que codifica un ácido nucleico heterólogo utilizado en el tratamiento del trastorno ocular en un individuo (p. ej., un ser humano) y una cápside que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran unión a HSPG (p. ej., reduce o elimina la unión a HSPG) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, en donde el ácido nucleico heterólogo está bajo el control de una secuencia de promotor que se expresa en la retina. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo está enlazado operativamente a un promotor adecuado para la expresión del polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico en uno o más tipos de células de la retina. En algunas realizaciones, la célula de la retina es una célula fotorreceptora, una célula epitelial pigmentada de la retina y/o una célula ganglionar. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de rodopsina quinasa (RK), un promotor de opsina, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de β-actina de pollo (CBA).

En algunos casos, los métodos comprenden el suministro subretiniano de partículas de rAAV que comprenden un vector rAAV que codifica un ácido nucleico heterólogo utilizado en el tratamiento del trastorno ocular en un individuo (p. ej., un ser humano) y una cápside que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a HSPG (p. ej., reduce o elimina la unión a HSPG) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, en donde el trastorno ocular se selecciona del grupo que consiste en degeneración retiniana autosómica recesiva grave de inicio temprano (amaurosis congénita de Leber), acromatopsia congénita, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Best, enfermedad de Doyne, distrofia de los conos, retinitis pigmentosa, retinosquisis ligada al cromosoma X, síndrome de Usher, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular atrófica relacionada con la edad, AMD neovascular, maculopatía diabética, retinopatía diabética proliferativa (PDR), edema macular cistoide, retinopatía serosa central, desprendimiento de retina, inflamación intraocular, glaucoma y uveítis posterior.

En algunos casos, los métodos comprenden el suministro subretiniano de una composición que comprende partículas de rAAV, en donde las partículas de rAAV comprenden un vector rAAV que codifica un ácido nucleico heterólogo utilizado en el tratamiento del trastorno ocular en un individuo (p. ej., un ser humano) y una cápside que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a HSPG (p. ej., reduce o elimina la unión a HSPG) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración de VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la concentración de las partículas en la composición es de aproximadamente 1×10^6 DRP/ml a aproximadamente 1×10^{14} DRP/ml. En algunas realizaciones, la composición de partículas de rAAV es eficaz para tratar la función visual del individuo. En algunas realizaciones, la función visual se evalúa mediante microperimetría, perimetría adaptada a la oscuridad, evaluación de la movilidad visual, agudeza visual, ERG o evaluación de la lectura. En algunas realizaciones, el método da como resultado una mejora en la función visual del individuo. En algunas realizaciones, el método da como resultado la prevención o una ralentización de la progresión del deterioro de la función visual del ser humano debido a la progresión del trastorno ocular.

En algunos casos, la divulgación proporciona sistemas para el suministro subretiniano de un vector a un ojo de un individuo, que comprende a) una composición que comprende una cantidad eficaz de partículas de rAAV, en donde i) una proteína de la cápside de las partículas de rAAV comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, y ii) el vector comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido terapéutico o ARN terapéutico y al menos una repetición terminal de AAV; y b) un dispositivo para el suministro retiniano del rAAV. En algunos casos, el dispositivo comprende una cánula de calibre fino y una jeringa, en donde la cánula de calibre fino es de calibre 27 a 45. En algunos casos, la composición de partículas de rAAV está contenida dentro de la jeringa. En algunos casos, la cánula está fijada a la jeringa. En algunas realizaciones, la concentración de las partículas en la composición es de aproximadamente 1×10^6 DRP/ml a aproximadamente 1×10^{14} DRP/ml.

En algunos casos, las partículas de rAAV del sistema comprenden una cápside de AAV2 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión de HSPG (p. ej., reduce o elimina la unión). En algunos casos, la sustitución de uno o más aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente un 75% o aproximadamente un 100%. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos aumentan la eficacia de transducción por la partícula de rAAV de una célula en el ojo o el SNC. En algunos casos, la sustitución de uno o más aminoácidos aumenta la eficiencia de la transducción por la partícula de rAAV de una célula en el ojo o el SNC en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%, p. ej., en comparación con una cápside de rAAV de referencia que comprende una proteína de la cápside de AAV de tipo salvaje. En algunos casos, la célula del ojo es una célula de la retina, una célula fotorreceptora, células epiteliales pigmentadas de la retina, células bipolares, células horizontales, células amacrinas, células de Müller y/o células ganglionares. En algunos casos, la célula del SNC es un oligodendrocito, astrocito, neurona, célula del parénquima cerebral, célula microglial, célula ependemal y/o una célula de Purkinje.

En algunos casos, las partículas de rAAV del sistema comprenden una cápside de AAV2 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión de HSPG (*p. ej.*, reduce o elimina la unión). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAV2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOS: 2, 4 y/o 6. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones en la posición R484 y R487 o en las posiciones R585 y R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En casos adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones de R484A y R487A o sustituciones de R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En casos adicionales, la cápside de AAV comprende sustituciones de aminoácidos R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV-2. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV1, una cápside de AAV2, una cápside de AAV3, una cápside de AAV6, una cápside de AAV8, una cápside de AAVrh8R, una cápside de AAV9 o una cápside de AAVrh10.

En algunos casos, las partículas de rAAV del sistema comprenden una cápside de AAV2 que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión de HSPG (*p. ej.*, reduce o elimina la unión). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 485, 488, 528, 533, 586 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAVrh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En otros casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En algunos casos, un residuo de aminoácido hidrófobo se sustituye con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En casos adicionales, la sustitución de uno o más aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de alanina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de alanina con un residuo de arginina o lisina. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos está en la posición 485, 488, 528, 533 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAVrh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos comprende una sustitución en la posición R485, R488, R533 o T589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV de SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la sustitución de un aminoácido comprende una sustitución R533A, numeración basada en VP1 de AAVrh8R.

En algunos casos, las partículas de rAAV del sistema comprenden una cápside de AAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a HSPG (*p. ej.*, reduce o elimina la unión) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2 y un vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un antioxidante, un factor neurotrófico, un factor anti-apoptótico, un factor anti-angiogénico y un factor antiinflamatorio. En casos adicionales, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: Prph2, RPE65, AIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, Clrina, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NFkB, Endostatina, Angiostatina, sFlt, sPDGF-R, IL10, anti-IL17, sIL17R, IL1-ra, anti-TGFβ, sTNF-R I, sTNF-R II e IL4. En otros casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un ácido nucleico terapéutico. En casos adicionales, el ácido nucleico terapéutico es un ARNip, un ARNh, un ARNi, un miARN, un ARN antisentido, una ribozima o una ADNzima. En algunos casos, el vector rAAV es un vector rAAV auto-complementario.

En algunos casos, las partículas de rAAV del sistema comprenden una cápside de AAV con una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a HSPG (*p. ej.*, reduce o elimina la unión) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2 y un vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo, en donde el ácido nucleico heterólogo está bajo el control de una secuencia de promotor que se expresa en la retina. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo está enlazado operativamente a un promotor adecuado para la expresión del polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico en uno o más tipos de células de la retina. En algunos casos, la célula de la retina es una célula fotorreceptora, una célula epitelial pigmentada de la retina y/o una célula ganglionar. En algunos casos, el promotor es un promotor de rodopsina quinasa (RK), un promotor de opsina, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de β-actina de pollo (CBA).

En algunos casos, las partículas de rAAV del sistema comprenden una cápside de AAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a HSPG (*p. ej.*, reduce o elimina la unión) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2 y un vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo, se utilizan para el suministro del ácido nucleico heterólogo a la retina de un individuo.

En algunos casos, el individuo es un ser humano. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo se utiliza para tratar un trastorno ocular seleccionado del grupo que consiste en: degeneración retiniana autosómica recesiva grave de inicio temprano (amaurosis congénita de Leber), acromatopsia congénita, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Best, enfermedad de Doyne, distrofia de conos, retinitis pigmentosa,

retinosquisis ligada al cromosoma X, síndrome de Usher, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular atrófica relacionada con la edad, AMD neovascular, maculopatía diabética, retinopatía diabética proliferativa (PDR), edema macular cistoide, retinopatía serosa central, desprendimiento de retina, inflamación intraocular, glaucoma y uveítis posterior.

En algunos casos, la divulgación proporciona un método para suministrar un ácido nucleico heterólogo al sistema nervioso central (SNC) de un individuo, que comprende administrar una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) al SNC del individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV. En algunos casos, la divulgación proporciona un método para mejorar la transducción de células del rAAV en el sistema nervioso central (SNC) de un individuo en comparación con la transducción de células con un rAAV que comprende una cápside de tipo salvaje, comprendiendo el método administrar una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) al SNC del individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en uno o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV. En casos adicionales, la divulgación proporciona un método para mejorar la expresión de un ácido nucleico heterólogo al sistema nervioso central (SNC) de un individuo, comprendiendo el método administrar una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) al SNC del individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV. En aún casos adicionales, la divulgación proporciona un método para tratar un trastorno del sistema nervioso central (SNC) de un individuo, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende una partícula de rAAV al SNC del individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV.

En algunas realizaciones de lo anterior, el ácido nucleico heterólogo se expresa a un nivel de expresión incrementado, en comparación con el nivel de expresión de un ácido nucleico heterólogo de una partícula de rAAV que comprende una cápside de rAAV de referencia. En algunas realizaciones, la expresión del ácido nucleico se incrementa en al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 25%, al menos

aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 75% o al menos aproximadamente un 100%. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV provoca una neuroinflamación reducida, en comparación con una partícula de rAAV que comprende una cápside de rAAV de referencia. En algunas realizaciones, la neuroinflamación se reduce en al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 25%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 75% o al menos aproximadamente un 100%. En la invención, la partícula rAAV comprende una cápside de serotipo 2 de AAV (AAV2). En la invención, la una o más sustituciones de aminoácidos reducen la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato. En algunas realizaciones, las una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato, en

comparación con la unión de una partícula de rAAV que comprende una cápside de rAAV de referencia al proteoglicano de heparán sulfato. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%, en comparación con la unión de una partícula de rAAV que comprende una cápside de referencia al proteoglicano de heparán sulfato. En algunas realizaciones, una cápside de rAAV de referencia comprende una cápside o proteína de cápside de rAAV de tipo salvaje. En algunas realizaciones, una cápside de rAAV de referencia comprende una cápside de rAAV o una proteína de la cápside que carece de una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos aumentan la eficacia de transducción por la partícula de rAAV de una célula en el ojo o el SNC. En algunas realizaciones, la sustitución de uno o más aminoácidos aumenta la eficiencia de la transducción por la partícula de rAAV de una célula en el ojo o el SNC en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%, *p. ej.*, en comparación con una cápside de rAAV de referencia que comprende una proteína de la cápside de AAV de tipo salvaje. En la invención, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV2. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV se administra en un único sitio.

En algunas realizaciones de lo anterior, la partícula de rAAV se suministra mediante suministro estereotáctico. En algunos casos, la partícula de rAAV se suministra mediante un suministro potenciado por convección. En algunos casos, la partícula de rAAV se administra utilizando un sistema de suministro CED. En algunos casos, el sistema de suministro de CED comprende una cánula y/o una bomba. En algunos casos, la cánula es una cánula resistente al reflujo o una cánula escalonada. En algunas realizaciones, la bomba es una bomba manual. En algunos casos, la bomba es una bomba osmótica. En algunos casos, la bomba es una bomba de infusión.

En algunos casos de lo anterior, la una o más sustituciones de aminoácidos está en 448, 451, 484, 487, 527, 532, 585 y/o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la numeración se basa en la VP1 de AAV2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En algunas realizaciones, una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R347, R350, K390, K395, R448, R451, R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En la invención, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOs: 2, 4 y/o 6. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R347A, R350A, K390A, K395A, R448A, R451A, R484A, R487A, K527A, K532A, R585A y/o R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones en la posición R484 y R487 o en las posiciones R585 y R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones de R484A y R487A o sustituciones de R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones de aminoácidos en R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones de aminoácidos en K532A, numeración basada en VP1 de AAV2.

En algunos casos de lo anterior, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 485, 488, 528, 533, 586 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AA VRh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AA VRh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En otros casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En algunos casos, un residuo de aminoácido hidrófobo se sustituye con un residuo de aminoácido cargado

positivamente. En casos adicionales, la sustitución de uno o más aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de alanina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de alanina con un residuo de arginina o lisina. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos está en la posición 485, 488, 528, 533 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAVrh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

En algunos casos, la sustitución de aminoácidos comprende una sustitución en la posición R485, R488, R533 o T589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV de SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la sustitución de un aminoácido comprende una sustitución R533A, numeración basada en VP1 de AAVrh8R.

En algunas realizaciones de lo anterior, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un gen asociado al SNC. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una enzima, un factor neurotrófico, un polipéptido deficiente o mutado en un individuo con un trastorno relacionado con el SNC, un antioxidante, un factor antiapoptótico, un factor anti-angiogénico y un factor antiinflamatorio, alfa-sinucleína, beta-glucosidasa ácida (GBA), beta-galactosidasa-1 (GLB1), iduronato 2-sulfatasa (IDS), galactosilceramidasa (GALC), una manosidasa, alfa-D-manosidasa (MAN2B1), beta-manosidasa (MANBA), pseudoarilsulfatasa A (ARSA), N-acetylglucosamina-1-fosfotransferasa (GNPTAB), esfingomielinasa ácida (ASM), proteína de Niemann-Pick C (NPC1), ácido alfa -1,4-glucosidasa (GAA), subunidad beta de hexosaminidasa, HEXB, N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa (MPS3A), N-alfa-acetilglucosaminidasa (NAGLU), heparina acetil-CoA, alfa-glucosaminidasa N-acetiltransferasa (MPS3C), N-acetylglucosamina-6-sulfatasa (GNS), alfa-N- acetilgalactosaminidasa (NAGA), beta-glucuronidasa (GUSB), subunidad alfa de hexosaminidasa (HEXA), huntingtina (HTT), lipasa ácida lisosomal (LIPA), aspartilglucosaminidasa, alfa-galactosidasa A, palmitoil proteína tioesterasa, tripeptidil peptidasa, proteína transmembrana lisosomal, transportador de cisteína, ceramidasa ácida, alfa-L- fucosidasa ácida, catepsina A, alfa-L-iduronidasa, arilsulfatasa B, arilsulfatasa A, N-acetylgalactosamina-6-sulfato, beta-galactosidasa ácida o alfa-neuramidasa. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), tirosina hidroxilasa (TH), GTP- ciclohidrolasa (GTPCH), aminoácido descarboxilasa (AADC), un antioxidante, un polipéptido antiangiogénico, un polipéptido antiinflamatorio y aspartoacilasa (ASPA). En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un ácido nucleico terapéutico. En algunas realizaciones, el ácido nucleico terapéutico es un ARNip, un ARNh, un ARNi, un miARN, un ARN antisentido, una ribozima o una ADNzima. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo está bajo el control de una secuencia de promotor que se expresa en una o más células del SNC. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo está bajo el control de una secuencia de promotor seleccionada del grupo que consiste en un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), un RSV LTR, un MoMLV LTR, un promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un virus simio 40 (SV40), un promotor de CK6, un promotor de transtiretina (TTR), un promotor de TK, un promotor sensible a tetraciclina (TRE), un promotor de VHB, un promotor de hAAT, un promotor de LSP, un promotor químico específico del hígado (LSP), un promotor de E2F, un promotor de telomerasa (hTERT); un potenciador de citomegalovirus/beta-actina de pollo/promotor de β-globina de conejo (CAG), un promotor del factor de elongación 1-alfa (EF1-alfa), un promotor de β-glucuronidasa humana, un promotor de β-actina de pollo (CBA), un promotor de LTR del virus del sarcoma de Rous retroviral (RSV), un promotor de dihidrofolato reductasa y un promotor de 13-actina. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo está enlazado operativamente a un promotor adecuado para la expresión del polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico en uno o más células del SNC. En algunos casos, la una o más células del SNC comprenden una o más células del cerebro. En algunos casos, la una o más células del SNC es un oligodendrocito, astrocito, neurona, célula del parénquima cerebral, célula microglial, célula ependemal y/o una célula de Purkinje. En algunos casos, la célula del cerebro es una neurona.

En algunas realizaciones de lo anterior, el vector rAAV es un vector rAAV auto-complementario. En algunas realizaciones, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el ácido nucleico heterólogo y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un complemento del ácido nucleico, en donde la primera secuencia de ácido nucleico puede formar pares de bases intracadena con la segunda secuencia de ácido nucleico a lo largo de la mayoría o toda su longitud. En algunas realizaciones, la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico están enlazadas por una ITR de AAV mutada, en donde la ITR de AAV mutada comprende una delección de la región D y comprende una mutación de la secuencia de resolución terminal.

En algunas realizaciones de lo anterior, el individuo es un ser humano.

En algunos casos, el trastorno es una enfermedad de almacenamiento lisosomal seleccionada del grupo que consiste en aspartilglusoaminuria, Fabry, enfermedad de Batten infantil (CNL1), enfermedad de Batten infantil tardía clásica (CNL2), enfermedad de Batten juvenil (CNL3), forma de Batten CNL4, forma de Batten CNL5, forma de Batten CNL6,

forma de Batten CNL7, forma de Batten CNL8, cistinosis, Farber, fucosidosis, galactosidosialidosis, enfermedad de Gaucher tipo 1, enfermedad de Gaucher tipo 2, enfermedad de Gaucher tipo 3, gangliosidosis GM1, enfermedad de Hunter, enfermedad de Krabbe, enfermedad de manosidosis α, enfermedad de manosidosis β, Maroteaux-Lamy,

5 A, enfermedad de Niemann-Pick B, enfermedad de Niemann-Pick C, enfermedad de Pompe, enfermedad de Sandhoff, enfermedad de Sanfillipo A, enfermedad de Sanfillipo B, enfermedad de Sanfillipo C, enfermedad de Sanfillipo D, enfermedad de Schindler, Schindler-Kanzaki, sialidosis, enfermedad de Sly, enfermedad de Tay-Sachs y enfermedad de Wolman

10 En algunos casos, la divulgación proporciona un método para tratar la enfermedad de Huntington en un individuo, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) al cuerpo estriado del individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico.

20 En algunos casos, la divulgación proporciona un método para tratar la enfermedad de Parkinson en un individuo, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) al cuerpo estriado del individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico es TH, GTPCII, GDNF, BDNF y/o AADC; o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico es AADC o un fragmento del mismo.

30 En algunas realizaciones de lo anterior, el ácido nucleico heterólogo se expresa a un nivel de expresión incrementado, en comparación con el nivel de expresión de un ácido nucleico heterólogo de una partícula de rAAV que comprende una cápside de rAAV de referencia. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV provoca una neuroinflamación reducida, en comparación con una partícula de rAAV que comprende una cápside de rAAV de referencia. En la invención, la partícula de rAAV comprende una cápside de serotipo 2 de AAV (AAV2). En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato. En algunas realizaciones, las una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato, en comparación con la unión de una partícula de rAAV que comprende una cápside de rAAV de referencia al proteoglicano de heparán sulfato. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un al menos el 100%, en comparación con la unión de una partícula de rAAV que comprende una cápside de referencia al proteoglicano de heparán sulfato. En algunas realizaciones, una cápside de rAAV de referencia comprende una cápside o proteína de cápside de rAAV de tipo salvaje. En algunas realizaciones, una cápside de rAAV de referencia comprende una cápside de rAAV o una proteína de la cápside que carece de una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato.

En algunas realizaciones de lo anterior, la partícula de rAAV se suministra mediante suministro estereotáctico. En algunos casos, la partícula de rAAV se suministra mediante un suministro potenciado por convección. En algunos casos, la partícula de rAAV se administra utilizando un sistema de suministro CED. En algunos casos, la cánula es una cánula resistente al reflujo o una cánula escalonada. En algunos casos, el sistema de suministro de CED comprende una cánula y/o una bomba. En algunos casos, la partícula de rAAV se administra utilizando un sistema de suministro CED. En algunos casos, la bomba es una bomba manual. En algunos casos, la bomba es una bomba osmótica. En algunos casos, la bomba es una bomba de infusión.

En algunos casos de lo anterior, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la numeración se basa en la VP1 de AAV2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En algunas realizaciones, una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina.

En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R347, R350, K390, K395, R448, R451, R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOs: 2, 4 y/o 6. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R347A, R350A, K390A, K395A, R448A, R451A, R484A, R487A, K527A, K532A, R585A y/o R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones en la posición R484 y R487 o en las posiciones R585 y R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones de R484A y R487A o sustituciones de R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones de aminoácidos en R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones de aminoácidos en K532A, numeración basada en VP1 de AAV2.

En algunos casos de lo anterior, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 485, 488, 528, 533, 586 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AA VRh8R. En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside con una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 485, 488, 528 o 533, numeración basada en la numeración VP1 de AA VRh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AA VRh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En otros casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En algunos casos, un residuo de aminoácido hidrófobo se sustituye con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En casos adicionales, la sustitución de uno o más aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de alanina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de alanina con un residuo de arginina o lisina. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos está en la posición 485, 488, 528, 533 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AA VRh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AA VRh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos comprende una sustitución en la posición R485, R488, R533 o T589, numeración basada en la numeración VP1 de AA VRh8R. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV de SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la sustitución de un aminoácido comprende una sustitución R533A, numeración basada en VP1 de AA VRh8R. En la invención, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV2.

En algunos casos de lo anterior, el ácido nucleico heterólogo está bajo el control de una secuencia de promotor que se expresa en una o más células del SNC. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo está bajo el control de una secuencia de promotor seleccionada del grupo que consiste en un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), un RSV LTR, un MoMLV LTR, un promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un virus simio 40 (SV40), un promotor de CK6, un promotor de transtiretina (TTR), un promotor de TK, un promotor sensible a tetraciclina (TRE), un promotor de VHB, un promotor de hAAT, un promotor de LSP, un promotor químérico específico del hígado (LSP), un promotor de E2F, un promotor de telomerasa (hTERT); un potenciador de citomegalovirus/beta-actina de pollo/promotor de β-globina de conejo (CAG), un promotor del factor de elongación 1-alfa (EFL-alfa), un promotor de β-glucuronidasa humana, un promotor de β-actina de pollo (CBA), un promotor de LTR del virus del sarcoma de Rous retroviral (RSV), un promotor de dihidrofolato reductasa y un promotor de 13-actina. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo está enlazado operativamente a un promotor adecuado para la expresión del polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico en uno o más células del SNC. En algunos casos, la una o más células del SNC comprenden una o más células del cerebro. En algunos casos, la una o más células del SNC es un oligodendrocito, astrocito, neurona, célula del parénquima cerebral, célula microglial, célula ependemal y/o una célula de Purkinje. En algunos casos, la célula del cerebro es una neurona.

En algunas realizaciones de lo anterior, el vector rAAV es un vector rAAV auto-complementario. En algunas realizaciones, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el ácido nucleico heterólogo y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un complemento del ácido nucleico, en donde la primera secuencia de ácido nucleico puede formar pares de bases intracadena con la segunda secuencia de ácido nucleico a

lo largo de la mayoría o toda su longitud. En algunas realizaciones, la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico están enlazadas por una ITR de AAV mutada, en donde la ITR de AAV mutada comprende una delección de la región D y comprende una mutación de la secuencia de resolución terminal.

5 En algunas realizaciones de lo anterior, el individuo es un ser humano.

En algunos casos, la divulgación proporciona un kit para uso en cualquiera de las realizaciones anteriores, que comprende una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV), en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV. En algunos casos, la divulgación proporciona un kit para suministrar un ácido nucleico heterólogo al sistema nervioso central (SNC) de un individuo que comprende una composición que comprende una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV), en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV. En algunos casos, la descripción proporciona un kit para tratar un trastorno del sistema nervioso central (SNC) en un individuo que comprende una composición que comprende una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV), en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende rAAVproteínas de la cápside que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo para tratar un trastorno del SNC y al menos una repetición terminal invertida de AAV.

25 En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico es TH, GTPCII, GDNF, BDNF y/o AADC; o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, el polipéptido terapéutico es AADC o un fragmento del mismo.

30 En algunos casos, la invención proporciona una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) para uso en cualquiera de las realizaciones anteriores. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) para suministrar un ácido nucleico heterólogo al sistema nervioso central (CNS) de un individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) para tratar un trastorno del sistema nervioso central (SNC) de un individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) para tratar la enfermedad de Huntington en un individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV, en donde la partícula de rAAV se formula para su suministro al cuerpo estriado. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) para tratar la enfermedad de Parkinson en un individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV, en donde la partícula de rAAV se formula para su suministro al cuerpo estriado. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) para tratar la enfermedad de Huntington en un individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV, en donde la partícula de rAAV se formula para su suministro al cuerpo estriado. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) para tratar la enfermedad de Huntington en un individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV, en donde la partícula de rAAV se formula para la administración en un solo sitio (*p. ej.*, al SNC de un individuo). En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) para tratar la enfermedad de Parkinson en un individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV, en donde la partícula de rAAV se formula para la administración en un solo sitio (*p. ej.*, al SNC de un individuo). En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) para tratar la enfermedad de Parkinson en un individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV, en donde la partícula de rAAV se formula para la administración en un solo sitio (*p. ej.*, al SNC de un individuo).

que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV, en donde la partícula de rAAV se formula para la administración en un solo sitio (*p. ej.*, al SNC de un individuo)

- 5 En algunas realizaciones de lo anterior, el ácido nucleico heterólogo se expresa a un nivel de expresión incrementado, en comparación con el nivel de expresión de un ácido nucleico heterólogo de una partícula de rAAV que comprende una cápside de rAAV de referencia. En algunos casos, la partícula de rAAV provoca una neuroinflamación reducida, en comparación con una partícula de rAAV que comprende una cápside de rAAV de referencia. En la invención, la partícula rAAV comprende una cápside de serotipo 2 de AAV (AAV2). En la invención, la una o más sustituciones de aminoácidos reducen la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato. En algunas realizaciones, las una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato, en comparación con la unión de una partícula de rAAV que comprende una cápside de rAAV de referencia al proteoglicano de heparán sulfato. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%, en comparación con la unión de una partícula de rAAV que comprende una cápside de referencia al proteoglicano de heparán sulfato. En algunas realizaciones, una cápside de rAAV de referencia comprende una cápside o proteína de cápside de rAAV de tipo salvaje. En algunas realizaciones, una cápside de rAAV de referencia comprende una cápside de rAAV o una proteína de la cápside que carece de una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- En algunos casos de lo anterior, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En algunas realizaciones, una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R347, R350, K390, K395, R448, R451, R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con las SEQ ID NOs: 2, 4 y/o 6. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R347A, R350A, K390A, K395A, R448A, R451A, R484A, R487A, K527A, K532A, R585A y/o R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones en la posición R484 y R487 o en las posiciones R585 y R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones de R484A y R487A o sustituciones de R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones de aminoácidos en R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones de aminoácidos en K532A, numeración basada en VP1 de AAV2. En la invención, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV2.
- En algunos casos de lo anterior, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 485, 488, 528, 533, 586 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AA VRh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AA VRh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En otros casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En algunos casos, un residuo de aminoácido hidrófobo se sustituye con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En casos adicionales, la sustitución de uno o más aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de alanina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos está en la posición 485, 488, 528, 533 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AA VRh8R. En algunos casos,

numeración se basa en la VP1 de AAVrh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos comprende una sustitución en la posición R485, R488, R533 o T589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV de SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una o más proteínas de la cápside de rAAV que tienen al menos aproximadamente el 90%, al menos aproximadamente el 91%, al menos aproximadamente el 92%, al menos aproximadamente el 93%, al menos aproximadamente el 94%, al menos aproximadamente el 95%, al menos aproximadamente el 96%, al menos aproximadamente el 97%, al menos aproximadamente el 98%, al menos aproximadamente el 99% o el 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11. En algunos casos, la sustitución de un aminoácido comprende una sustitución R533A, numeración basada en VP1 de AAVrh8R.

En algunos casos de lo anterior, el ácido nucleico heterólogos está bajo el control de una secuencia de promotor que se expresa en una o más células del SNC. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogos está bajo el control de una secuencia de promotor seleccionada del grupo que consiste en un promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), un RSV LTR, un MoMLV LTR, un promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un virus simio 40 (SV40), un promotor de CK6, un promotor de transtiretina (TTR), un promotor de TK, un promotor sensible a tetraciclina (TRE), un promotor de VHB, un promotor de hAAT, un promotor de LSP, un promotor químico específico del hígado (LSP), un promotor de E2F, un promotor de telomerasa (hTERT); un potenciador de citomegalovirus/beta-actina de pollo/promotor de β-globina de conejo (CAG), un promotor del factor de elongación 1-alfa (EF1-alfa), un promotor de β-glucuronidasa humana, un promotor de β-actina de pollo (CBA), un promotor de LTR del virus del sarcoma de Rous retroviral (RSV), un promotor de dihidrofolato reductasa y un promotor de 13-actina. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogos está enlazado operativamente a un promotor adecuado para la expresión del polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico en uno o más células del SNC. En algunos casos, la una o más células del SNC comprenden una o más células del cerebro. En algunos casos, la una o más células del SNC es un oligodendrocito, astrocito, neurona, célula del parénquima cerebral, célula microglial, célula ependimal y/o una célula de Purkinje.

En algunas realizaciones de lo anterior, el vector rAAV es un vector rAAV auto-complementario. En algunas realizaciones, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el ácido nucleico heterólogos y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un complemento del ácido nucleico, en donde la primera secuencia de ácido nucleico puede formar pares de bases intracadena con la segunda secuencia de ácido nucleico a lo largo de la mayoría o toda su longitud. En algunas realizaciones, la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico están enlazadas por una ITR de AAV mutada, en donde la ITR de AAV mutada comprende una delección de la región D y comprende una mutación de la secuencia de resolución terminal.

En algunas realizaciones de lo anterior, el individuo es un ser humano.

En algunas realizaciones de lo anterior, las partículas de rAAV están en una composición. En algunas realizaciones, la composición comprende un tampón y/o un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende, además, instrucciones para el suministro de la composición de partículas de rAAV al SNC. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende, además, instrucciones para el suministro de la composición de partículas de rAAV al cuerpo estriado.

En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAVrh8R, en donde la proteína de la cápside de AAVrh8R comprende una o más sustituciones de aminoácidos, en donde la una o más sustituciones de aminoácidos aumentan la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en comparación con una partícula de AAV que comprende una proteína de la cápside AAVrh8R de tipo salvaje, o en donde la sustitución de uno o más aminoácidos está en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos aumenta la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos está en la posición 586, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAVrh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos comprende una sustitución en la posición A586, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la sustitución de un aminoácido comprende una sustitución A586R o A586K, numeración basada en VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV de SEQ ID NO: 10.

En algunos casos, la divulgación proporciona un método para aumentar la unión de una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAVrh8R al proteoglicano de heparán sulfato, que comprende introducir una o más sustituciones de aminoácidos en la proteína de la cápside, en donde la una o más sustituciones de aminoácidos aumenta la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en comparación con una partícula de AAV que comprende una proteína de la cápside de AAVrh8R de tipo salvaje. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos aumenta la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%,

aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos está en la posición 586, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAVrh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la sustitución de aminoácidos comprende una sustitución en la posición A586, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la sustitución de un aminoácido comprende una sustitución A586R o A586K, numeración basada en VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV de SEQ ID NO: 10.

En algunos casos, la divulgación proporciona un método para suministrar un ácido nucleico heterólogo a la retina de un individuo, que comprende administrar una partícula de virus adeno-associado recombinante (rAAV) al individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV. En algunos casos, la divulgación proporciona un método para mejorar la transducción de células de rAAV después del suministro intravítreo de una partícula de rAAV al ojo de un individuo en comparación con la transducción de células con un rAAV que comprende una cápside de tipo salvaje, comprendiendo el método incorporar una o más sustituciones de aminoácidos en una proteína de la cápside de AAV en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2; en donde la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV y un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV. En otros casos, la divulgación proporciona un método para mejorar la expresión de un ácido nucleico heterólogo después del suministro intrevitreal de partículas de rAAV al ojo de un individuo, comprendiendo el método incorporar una o más sustituciones de aminoácidos en una proteína de la cápside de AAV en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2; en donde la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV y un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV. En algunos casos, la divulgación proporciona un método para tratar un trastorno ocular en un individuo, que comprenden el suministro de una composición que comprende partículas de rAAV a la retina de un individuo, en donde las partículas de rAAV comprenden a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV. En algunos casos, la divulgación proporciona un sistema para el suministro de un vector a un ojo de un individuo, que comprende a) una composición que comprende una cantidad eficaz de partículas de rAAV, en donde i) una proteína de la cápside de las partículas de rAAV comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y ii) el vector comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido terapéutico o ARN terapéutico y al menos una repetición terminal de AAV; y b) un dispositivo para el suministro intravítreo del rAAV. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de serotipo AAVrh8R, AAV1, AAV6, AAV8, AAV9 o AAVrh10. En algunos casos, la divulgación proporciona un kit para tratar un trastorno ocular, que comprende a) una composición que comprende partículas de rAAV, en donde la partícula de rAAV comprende i) una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, y ii) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo para tratar un trastorno ocular y al menos una repetición terminal invertida de AAV; y b) un excipiente farmacéutico adecuado para administración intravítreo. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAVrh8R, AAV1, AAV6, AAV8, AAV9 o AAVrh10. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAV1, en donde la proteína de la cápside de AAV1 comprende una o más sustituciones de aminoácidos, en donde la una o más sustituciones de aminoácidos aumentan la eficiencia de la transducción de la partícula de rAAV a una célula en el ojo en comparación con una partícula de AAV que comprende una proteína de la cápside AAV1 de tipo salvaje, o en donde la una o más sustituciones de aminoácidos está en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAV6, en donde la proteína de la cápside de AAV6 comprende una o más sustituciones de aminoácidos, en donde la una o más sustituciones de aminoácidos aumentan la eficiencia de la transducción de la partícula de rAAV a una célula en el ojo en comparación con una partícula de AAV que comprende una proteína de la cápside AAV6 de tipo salvaje, o en donde la una o más sustituciones de aminoácidos está en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAV8, en donde la proteína de la cápside de AAV8 comprende una o más sustituciones de aminoácidos, en donde la una o más sustituciones de aminoácidos aumentan la eficiencia de la transducción de la partícula de rAAV a una célula en el ojo en comparación con una partícula de AAV que comprende una proteína de la cápside AAV8 de tipo salvaje, o en donde la una o más sustituciones de aminoácidos está en una o más posiciones

correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAV9, en donde la proteína de la cápside de AAV9 comprende una o más sustituciones de aminoácidos, en donde la una o más sustituciones de aminoácidos aumentan la eficiencia de la transducción de la partícula de rAAV a una célula en el ojo en comparación con una partícula de AAV que comprende una proteína de la cápside AAV9 de tipo salvaje, o en donde la una o más sustituciones de aminoácidos está en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAVrh10, en donde la proteína de la cápside de AAVrh10 comprende una o más sustituciones de aminoácidos, en donde la una o más sustituciones de aminoácidos aumentan la eficiencia de la transducción de la partícula de rAAV a una célula en el ojo en comparación con una partícula de AAV que comprende una proteína de la cápside AAVrh10 de tipo salvaje, o en donde la una o más sustituciones de aminoácidos está en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAV3, en donde la proteína de la cápside de AAV3 comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAV1, una cápside de AAV2, una cápside de AAV3, una cápside de AAV6, una cápside de AAV8, una cápside de AAVrh8R, una cápside de AAV9 o una cápside de AAVrh10. En algunas realizaciones, la eficiencia de la transducción se incrementa en al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 25%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 75% o al menos aproximadamente un 100%.

En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos incrementa la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos aumenta la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos aumenta la eficiencia de la transducción de la partícula de rAAV para una célula en el ojo o el sistema nervioso central en comparación con una partícula de AAV que comprende una proteína de la cápside de AAVrh8R de tipo salvaje en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%. En algunos casos, la célula del ojo es una célula de la retina, una célula fotorreceptora, células epiteliales pigmentadas de la retina, células bipolares, células horizontales, células amacrinas, células de Müller y/o células ganglionares. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente reemplaza a un residuo de aminoácido hidrófobo. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de alanina, serina, glutamina o treonina con un residuo de arginina o lisina. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de serotipo rh8R de AAV (AAVrh8R). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos están en la posición 586 y/o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAVrh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición A586 y/o T589, numeración basada en VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución A586R o A586K, numeración basada en VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución T589R o T589K, numeración basada en VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV serotipo 1 (AAV1). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos están en la posición 586 y/o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAV1. En algunos casos, la VP1 de AAV1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición S586 y/o T589, numeración basada en VP1 de AAV1. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución S586R o S586K, numeración basada en VP1 de AAV1. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución T589R o T589K, numeración basada en VP1 de AAV1. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución 586 y/o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAV6. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAV6 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición S586 y/o T589, numeración basada en VP1 de AAV6. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución S586R, numeración basada en VP1 de AAV6. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución T589R o T589K, numeración basada en VP1 de AAV6. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución 588 y/o 591, numeración basada en la numeración VP1 de AAV8. En algunos casos, la VP1 de AAV8 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición Q588 y/o T591, numeración basada en VP1 de AAV8. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución Q588R o Q588K, numeración basada en VP1 de AAV8. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución T591R, numeración basada

en VP1 de AAV8. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV serotipo 9 (AAV9). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos están en la posición 586 y/o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAV9. En algunos casos, la VP1 de AAV9 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición S586 y/o A589, numeración basada en VP1 de AAV9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución S586R o S586K, numeración basada en VP1 de AAV9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución A589R o A589K, numeración basada en VP1 de AAV9. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de serotipo rh10 de AAV (AAVrh10). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos están en la posición 588 y/o 591, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh10. En algunos casos, la VP1 de AAVrh10 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición Q588 y/o A591, numeración basada en VP1 de AAVrh10. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución Q588R o Q588K, numeración basada en VP1 de AAVrh10. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución A591R o A591K, numeración basada en VP1 de AAVrh10. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de AAV3, en donde la proteína de la cápside de AAV3 comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos aumenta la eficiencia de la transducción de la partícula de rAAV para una célula en el ojo o el sistema nervioso central en comparación con una partícula de AAV que comprende una proteína de la cápside de AAVrh8R de tipo salvaje en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV1, una cápside de AAV2, una cápside de AAV3, una cápside de AAV6, una cápside de AAV8, una cápside de AAVrh8R, una cápside de AAV9 o una cápside de AAVrh10. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un antioxidante, un factor neurotrófico, un factor anti-apoptótico, un factor anti-angiogénico y un factor antiinflamatorio. En casos adicionales, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: Prph2, RPE65, APIPL1, GUCY2D, LCA5, CRX, CEP290, MYO 7a, Clarina, ABCA4, RDH12, IMPDH1, CRB1, LRAT, NMNAT1, TULP1, MERTK, RPGR, RP2, RPGRIP, CNGA3, CNGB3, GNAT2, GDNF, CNTF, FGF2, PEDF, EPO, BCL2, BCL-X, NPkB, Endostatina, Angiostatina, sFlt, sPDGF-R, IL10, anti-IL17, sIL17R, IL1-ra, anti-TGFβ, sTNF-R I, sTNF-R II e IL4. En otros casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un ácido nucleico terapéutico. En casos adicionales, el ácido nucleico terapéutico es un ARNip, un ARNh, un ARNi, un miARN, un ARN antisentido, una ribozima o una ADNzima. En algunos casos, el vector rAAV es un vector rAAV auto-complementario. En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que alteran la unión a HSPG (p. ej., reduce o elimina la unión a HSPG) o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2 y un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico, en donde el ácido nucleico heterólogo está bajo el control de una secuencia de promotor que se expresa en la retina. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo está enlazado operativamente a un promotor adecuado para la expresión del polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico en uno o más tipos de células de la retina. En algunos casos, la célula de la retina es una célula fotorreceptora, células epiteliales pigmentadas de la retina, células bipolares, células horizontales, células amacrinas, células de Müller y/o células ganglionares. En algunos casos, el promotor es un promotor de rodopsina quinasa (RK), un promotor de opsina, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de β-actina de pollo (CBA). En algunos casos, el individuo es un ser humano. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo se utiliza para tratar un trastorno ocular seleccionado del grupo que consiste en: degeneración retiniana autosómica recesiva grave de inicio temprano (amaurosis congénita de Leber), acromatopsia congénita, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Best, enfermedad de Doyne, distrofia de conos, retinitis pigmentosa, retinosquisis ligada al cromosoma X, síndrome de Usher, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular atrófica relacionada con la edad, AMD neovascular, maculopatía diabética, retinopatía diabética proliferativa (PDR), edema macular cistoide, retinopatía serosa central, desprendimiento de retina, inflamación intraocular, glaucoma y uveítis posterior. En algunos casos, el vector rAAV es un vector rAAV auto-complementario. En algunos casos, el vector comprende una primera secuencia de ácido nucleico que codifica el ácido nucleico heterólogo y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un complemento del ácido nucleico, en donde la primera secuencia de ácido nucleico puede formar pares de bases intracadena con la segunda secuencia de ácido nucleico a lo largo de la mayoría o toda su longitud. En algunos casos, la primera secuencia de ácido nucleico y la segunda secuencia de ácido nucleico están enlazadas por una ITR de AAV mutada, en donde la ITR de AAV mutada comprende una delección de la región D y comprende una mutación de la secuencia de resolución terminal. En algunos casos, el individuo es un ser humano. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos aumenta la eficiencia de la transducción de la partícula de rAAV para una célula en el ojo o el sistema nervioso central en comparación con una partícula de AAV que comprende una proteína de la cápside de AAVrh8R de tipo salvaje en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1** indica los residuos de la cápside implicados en la unión del proteoglicano de heparán sulfato y las mutaciones introducidas para generar el mutante AAV2 HBKO. La numeración se basa en la secuencia de aminoácidos de VP1.

5 La **FIG. 2** muestra la disminución en la transducción de células 293 en cultivo observada con partículas de AAV2 mutantes de HBKO (AAV2 HBKO CBA-sFLT02), en comparación con partículas de AAV2 de tipo salvaje (AAV2 CBA-sFLT02). La transducción se ensayó midiendo la cantidad de Flt soluble (sFLT) presente en el medio de cultivo celular 48 horas después de la inyección con partículas de AAV2 de tipo salvaje o mutantes de HBKO que portan vectores que utilizan el promotor de CBA para impulsar la expresión de Flt.

10 15 La **FIG. 3** muestra la disminución en la transducción de células 293 y Hela en cultivo observada con partículas de AAV2 mutantes de HBKO (AAV2 HBKO CBA- GFP), en comparación con partículas de AAV2 de tipo salvaje (AAV2 CBA-GFP). La transducción se ensayó mediante formación de imágenes por fluorescencia de células tomadas 48 horas después de la inyección con partículas AAV2 de tipo salvaje o mutantes de HBKO que portan vectores que utilizan el promotor de CBA para impulsar la expresión de EGFP.

20 Las **FIGS. 4A y 4B** muestran la transducción observada tras la inyección intravítreo (**FIG. 4A**) o subretiniana (**FIG. 4B**) de partículas AAV2 de tipo salvaje o mutantes de HBKO. La transducción se ensayó mediante la expresión de Flt soluble (sFLT) después de la transducción con vectores que codifican Flt. El número de genomas de vector inyectados se indica para cada uno de los experimentos (10^8 o 10^9 vg).

25 La **FIG. 5** muestra que las partículas de AAV2 mutantes de HBKO no logran transducir el ojo del ratón después de inyección intravítreo. A los ratones se les administró una inyección intravítreo de partículas de AAV2 de tipo salvaje (AAV2 CBA-GFP) o mutantes de HBKO (AAV2 HBKO CBA-GFP) que portan vectores que utilizan el promotor de CBA para impulsar la expresión de EGFP, y las secciones se obtuvieron mediante microscopía de fluorescencia.

30 35 La **FIG. 6** muestra que las partículas de AAV2 mutantes de HBKO (AAV2 CBA HBKO) provocan un aumento significativo en la transducción después de la inyección subretiniana, en comparación con partículas de tipo salvaje (AAV2 CBA). La transducción se ensayó mediante la expresión de Flt soluble (sFLT) después de la inyección con partículas de AAV2 que portan vectores que utilizan el promotor de CBA para impulsar la expresión de Flt. Se indica el número de genomas de vector inyectados (10^8 o 10^9 vg).

40 45 La **FIG. 7** muestra que las partículas de AAV2 mutantes de HBKO (AAV2 HBKO CBA - GFP) provocan un aumento significativo en la transducción de células fotorreceptoras (como se marcan) después de la inyección subretiniana, en comparación con partículas de tipo salvaje (AAV2 CBA- GFP). La transducción se midió mediante formación de imágenes por fluorescencia de la expresión de GFP después de la transducción con partículas de AAV2 que portan vectores que utilizan el promotor de CBA para impulsar la expresión de EGFP.

50 55 La **FIG. 8** muestra que las partículas de AAV2 mutantes de HBKO (AAV2 RK HBKO) provocan un aumento significativo en la transducción de fotorreceptores después de la inyección subretiniana, en comparación con partículas de tipo salvaje (AAV2 RK). La transducción se ensayó mediante la expresión de Flt soluble (sFLT) después de la inyección con partículas de AAV2 que portan vectores que utilizan el promotor de rodopsina quinasa (RK) para impulsar la expresión de Flt. Se indica el número de genomas de vector inyectados (10^8 o 10^9 vg).

60 65 Las **FIGS. 9A y 9B** muestran la expresión de EGFP en el cerebro de ratón 30 días después de la inyección intraestriatal de AAV2HBKO-EGFP (**FIG. 9A**), en comparación con AAV2-EGFP (**FIG. 9B**) en ratones de tipo salvaje. En cada uno de los paneles, la expresión de EGFP fue impulsada por el promotor de CBA y visualizada utilizando microscopía de fluorescencia.

70 75 Las **FIGS. 10A y 10B** muestran la expresión de GFP en el cerebro de ratón 30 días después de la inyección intraestriatal de AAV2HBKO-miARN-Htt-GFP (**FIG. 10A**), en comparación con AAV1-miARN-Htt-GFP (**FIG. 10B**) en ratones YAC128 HD. Los vectores de miARN - Htt -GFP se refieren a construcciones que expresan un miARN artificial que fija como objetivo Htt humano y un informador de GFP. En cada uno de los paneles, la expresión de GFP fue impulsada por el promotor de CBA y visualizada utilizando microscopía de fluorescencia a tres aumentos diferentes (4X, 10X y 20X, como se marca).

80 85 La **FIG. 11A** muestra el análisis de qPCR de los niveles de ARNm de HTT humano en punciones de cerebro de ratón estriatal 30 días después de la inyección de AAV1-miARN-Htt y AAV2HBKO-miARN-Htt, en comparación con controles no tratados.

90 95 La **FIG. 11B** muestra el análisis de transferencia Western de los niveles de proteína Htt humana en punciones de cerebro de ratón cortical 30 días después de la inyección de AAV1-miARN-Htt y AAV2HBKO-miARN-Htt, en comparación con controles no tratados.

Las FIGS. 12A-12C muestran la expresión de Iba1 en el cuerpo estriado de ratón YAC128 30 días después de la inyección con AAV2HBKO-miARN-Htt-GFP (FIG. 12B) o AAV1-miARN-Htt-GFP (FIG. 12C), en comparación con los controles no tratados (FIG. 12A).

5 Las FIGS. 13A-13C muestran la expresión de GFP en el cuerpo estriado de ratón YAC128 30 días después de la inyección con AAV2HBKO-miARN-Htt-GFP (FIG. 13B) o AAV1-miARN-Htt-GFP (FIG. 13C), en comparación con los controles no tratados (FIG. 13A).

10 La FIG. 14 compara los residuos de la cápside implicados en la unión de proteoglicanos de heparán sulfato entre las cápsides de AAV2 y AAVrh8R. La numeración se basa en la secuencia de aminoácidos de VP1.

15 La FIG. 15 muestra un alineamiento de aminoácidos de AAV2 y AAVrh8R en los residuos responsables para la unión de heparan de AAV2. Las posiciones de las modificaciones de la cápside de arginina AAVrh8R están marcadas con un círculo.

15 La FIG. 16A muestra la transducción *in vitro* mejorada de células HeLa exhibida por el mutante de AAVrh8R A586R, en comparación con AAVrh8R de tipo salvaje. La transducción se controló mediante sFLT02 en medio de cultivo 48 horas después de la infección con AAVrh8R o los vectores modificados con arginina AAVrh8R.

20 La FIG. 16B muestra la transducción *in vitro* disminuida de células HeLaRC32 exhibida por el mutante de AAVrh8R R533A, en comparación con AAVrh8R de tipo salvaje. La transducción se controló mediante sFLT02 en medio de cultivo 48 horas después de la infección con AAVrh8R o los vectores modificados con arginina AAVrh8R.

25 Las FIGS. 17A-17D muestran los niveles de transducción *in vitro* exhibidos por los mutantes de AAVrh8R A586R y R533A, en comparación con AAVrh8R de tipo salvaje. El mutante AAVrh8R A586R (FIG. 17B) muestra una transducción *in vitro* incrementada de células NS1, en comparación con AAVrh8R de tipo salvaje (FIG. 17A). El mutante AAVrh8R R533A (FIG. 17D) muestra una transducción *in vitro* disminuida de células HeLa, en comparación con AAVrh8R de tipo salvaje (FIG. 17C). La transducción se controló mediante la expresión de EGFP en células 48 horas después de la infección con AAVrh8R o los vectores modificados con arginina AAVrh8R.

30 35 Las FIGS. 18A y 18B muestran los niveles de transducción subretiniana en ratones C57B16 exhibidos por mutantes AAVrh8R A586R y R533A. (FIG. 18A) El mutante AAVrh8R A586R muestra una transducción subretiniana disminuida, en comparación con AAVrh8R de tipo salvaje. También se testó el vector AAV2. (FIG. 18B) El mutante AAVrh8R R533A muestra una transducción subretiniana incrementada, en comparación con AAVrh8R de tipo salvaje y ratones naif. La transducción se controló mediante sFLT02 en lisados retinianos de ratones C57B16 30 días después de la administración subretiniana de vectores modificados con arginina AAVrh8R o AAVrh8R.

40 45 La FIG. 19 muestra los niveles de sFLT02 en lisados de retina de ratones C57B16 30 días después de la administración intravítreo de vectores AAV2, AAVrh8R o AAVrh8R-A586R.

La FIG. 20 muestra un alineamiento de aminoácidos en los residuos responsables de la unión de heparán de AAV2 con AAVrh8R, AAV1, AAV6, AAV8, AAV9 y AAVrh10.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

50 Tal como se describe en esta memoria, los autores de la invención han descubierto, sorprendentemente, que modificaciones en las partículas de rAAV correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 532, 585 y/o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, demuestran una transducción incrementada de células después de la administración al ojo de un sujeto. Sin desear estar ligado a teoría alguna, se cree que estas partículas de rAAV han reducido o eliminado la unión a HSPG o tienen una carga modificada en la cápside de tal manera que la administración de las partículas de rAAV da como resultado una transducción incrementada de células en el ojo de un sujeto. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona métodos para suministrar un ácido nucleico heterólogo al ojo de un individuo, que comprende administrar una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) al ojo del individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV. En la invención, las sustituciones de aminoácidos dan como resultado una unión reducida o eliminada a HSPG.

65 En algunos casos, la presente divulgación proporciona métodos para suministrar un ácido nucleico heterólogo al ojo de un individuo, que comprenden administrar una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) a la subretina del individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende proteínas

de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV.

- 5 En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para mejorar la transducción de células de rAAV después del suministro subretiniano de una partícula de rAAV al ojo de un individuo en comparación con la transducción de células con un rAAV que comprende una cápside de tipo salvaje, comprendiendo el método incorporar una o más sustituciones de aminoácidos en una proteína de la cápside de AAV en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato, en donde la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV y un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV. En la invención, las sustituciones de aminoácidos dan como resultado una unión reducida o eliminada a HSPG. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside que comprende sustituciones R585A y R588A de rAAV2, numeración basada en VP1 de AAV2 (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside que comprende sustituciones A586R y/o R533A de AAVrh8R, numeración basada en VP1 de AAVrh8R (SEQ ID NO: 9).
- 10 15 En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para mejorar la supresión de un ácido nucleico heterólogo después del suministro subretiniano de partículas de rAAV al ojo de un individuo, comprendiendo el método incorporar una o más sustituciones de aminoácidos en una proteína de la cápside de AAV en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato, en donde la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV y un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV. En la invención, las sustituciones de aminoácidos dan como resultado una unión reducida o eliminada a HSPG. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside que comprende sustituciones R585A y R588A de rAAV2, numeración basada en VP1 de AAV2 (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside que comprende sustituciones A586R y/o R533A de AAVrh8R, numeración basada en VP1 de AAVrh8R (SEQ ID NO: 9).
- 20 25 En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para mejorar la supresión de un ácido nucleico heterólogo después del suministro subretiniano de partículas de rAAV al ojo de un individuo, comprendiendo el método incorporar una o más sustituciones de aminoácidos en una proteína de la cápside de AAV en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato, en donde la partícula de rAAV comprende la proteína de la cápside de rAAV y un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV. La mejora es que la transducción se compara con las partículas de rAAV que comprenden la cápside de tipo salvaje. En la invención, las sustituciones de aminoácidos dan como resultado una unión reducida o eliminada a HSPG. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside que comprende sustituciones R585A y R588A de rAAV2, numeración basada en VP1 de AAV2 (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside que comprende sustituciones A586R y/o R533A de AAVrh8R, numeración basada en VP1 de AAVrh8R (SEQ ID NO: 9).
- 30 35 En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para tratar un trastorno ocular en un individuo, que comprenden el suministro de una composición que comprende una cantidad eficaz de partículas de rAAV a la retina de un individuo, en donde las partículas de rAAV comprenden a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV. En la invención, las sustituciones de aminoácidos dan como resultado una unión reducida o eliminada a HSPG. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside que comprende sustituciones R585A y R588A de rAAV2, numeración basada en VP1 de AAV2 (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside que comprende sustituciones A586R y/o R533A de AAVrh8R, numeración basada en VP1 de AAVrh8R (SEQ ID NO: 9).
- 40 45 En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para el suministro subretiniano de un vector a un ojo de un individuo, que comprende a) una composición que comprende una cantidad eficaz de partículas de rAAV, en donde i) una proteína de la cápside de las partículas de rAAV comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato, y ii) el vector comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido terapéutico o ARN terapéutico y al menos una repetición terminal de AAV; y b) un dispositivo para el suministro retiniano del rAAV. En la invención, las sustituciones de aminoácidos dan como resultado una unión reducida o eliminada a HSPG. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside que comprende sustituciones R585A y R588A de rAAV2, numeración basada en VP1 de AAV2 (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside que comprende sustituciones A586R y/o R533A de AAVrh8R, numeración basada en VP1 de AAVrh8R (SEQ ID NO: 9).
- 50 55 60 65 La divulgación proporciona también sistemas para el suministro subretiniano de un vector a un ojo de un individuo, que comprende a) una composición que comprende una cantidad eficaz de partículas de rAAV, en donde i) una proteína de la cápside de las partículas de rAAV comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato, y b) un vector comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido terapéutico o ARN terapéutico y al menos una repetición terminal de AAV. En la invención, las sustituciones de aminoácidos dan como resultado una unión reducida o eliminada a HSPG. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside que comprende sustituciones R585A y R588A de rAAV2, numeración basada en VP1 de AAV2 (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside que comprende sustituciones A586R y/o R533A de AAVrh8R, numeración basada en VP1 de AAVrh8R (SEQ ID NO: 9).
- En algunos casos, la presente divulgación proporciona, además, métodos para suministrar un ácido nucleico heterólogo al sistema nervioso central (SNC) de un individuo, que comprenden administrar una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) al SNC del individuo. La partícula de rAAV comprende (a) una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato, y (b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV. Estos métodos exhiben una expresión de

ácido nucleico heterólogo y/o transducción de células de rAAV mejoradas después del suministro de una partícula de rAAV al SNC de un individuo, *p. ej.*, en comparación con la transducción de células con un rAAV que comprende una cápside de tipo salvaje. Partículas de rAAV y métodos de este tipo son adecuados para uso en el tratamiento de trastornos del SNC, incluyendo, pero no limitados a la enfermedad de Huntington. En la invención, las sustituciones de aminoácidos dan como resultado una unión reducida o eliminada a HSPG. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside que comprende sustituciones R585A y R588A de rAAV2, numeración basada en VP1 de AAV2 (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una cápside que comprende sustituciones A586R y/o R533A de AAVrh8R, numeración basada en VP1 de AAVrh8R (SEQ ID NO: 9).

10 I. Técnicas Generales

Las técnicas y los procesos descritos o referenciados en esta memoria se entienden generalmente bien y se emplean comúnmente utilizando metodología convencional por los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook et al., 4^a ed., 5 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., 2003); la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds., 1995); Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow y Lane, eds., 1988); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I. Freshney, 6^a ed., J. Wiley and Sons, 2010); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell 15 Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, 20 y D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1996); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase 25 Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., J. Wiley and Sons, 2002); Immunobiology (C.A. Janeway et al., 30 2004); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 2011).

II. Definiciones

35 Un "vector", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un plásmido o virus recombinante que comprende un ácido nucleico a ser suministrado a una célula huésped, ya sea *in vitro* o *in vivo*.

El término "polinucleótido" o la expresión "ácido nucleico", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por lo tanto, este 40 término o expresión incluye, pero no se limita a, ADN o ARN de cadena sencilla, doble o multi.cadena, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina, u otras bases de nucleótidos naturales, química o bioquímicamente modificadas, no naturales o derivatizadas. La cadena principal del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato (tal como se pueden encontrar típicamente en el ARN o ADN), o grupos azúcar o fosfato modificados o sustituidos. Alternativamente, la cadena principal del polinucleótido 45 puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamidatos y, por lo tanto, puede ser un oligodesoxinucleósido fosforamidato (P-NH₂) o un oligómero de fosforamidato-fosfodiéster mixto. Además, se puede obtener un polinucleótido de doble cadena a partir del producto polinucleotídico de cadena sencilla de la síntesis química, ya sea sintetizando la cadena complementaria y reasociando las cadenas en condiciones adecuadas, o sintetizando la cadena complementaria de novo utilizando una ADN polimerasa con un cebador apropiado.

50 Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos y no se limitan a una longitud mínima. Polímeros de residuos de aminoácidos de este tipo pueden 55 contener residuos de aminoácidos naturales o no naturales e incluyen, pero no se limitan a péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros y multímeros de residuos de aminoácidos. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas quedan abarcados por la definición. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los fines de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, 60 tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), a la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, tal como por mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como por mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR.

Un "vector viral recombinante" se refiere a un vector polinucleotídico recombinante que comprende una o más secuencias heterólogas (*es decir*, una secuencia de ácido nucleico que no es de origen viral). En el caso de los vectores AAV recombinantes, el ácido nucleico recombinante está flanqueado por al menos una secuencia repetida terminal invertida (ITR). En algunas realizaciones, el ácido nucleico recombinante está flanqueado por dos ITRs.

Un "vector AAV recombinante (vector rAAV)" se refiere a un vector polinucleotídico que comprende una o más secuencias heterólogas (*es decir*, una secuencia de ácido nucleico que no es de origen AAV) que están flanqueadas por al menos una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV. Vectores rAAV de este tipo se pueden replicar y empaquetar en partículas virales infecciosas cuando están presentes en una célula huésped que ha sido

5 infectada con un virus auxiliar adecuado (o que expresa funciones auxiliares adecuadas) y que expresa productos génicos rep y cap de AAV (*es decir*, proteínas AAV Rep y Cap). Cuando un vector rAAV se incorpora en un polinucleótido más grande (*p. ej.*, en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido utilizado para la clonación o transfección), entonces el vector rAAV puede denominarse "pro-vector" que puede ser "rescatado" por replicación y encapsidación en presencia de funciones de empaquetamiento de AAV y funciones auxiliares adecuadas. Un vector rAAV puede estar en cualquiera de un cierto número de formas, incluyendo, pero no limitadas a plásmidos, cromosomas lineales artificiales, complejados con lípidos, encapsulados dentro de liposomas y encapsulados en una partícula viral, *p. ej.*, una partícula de AAV. Un vector rAAV puede empaquetarse en una cápside de virus de AAV para generar una "partícula viral adeno-asociada recombinante (partícula de rAAV)".

10 15 Un «virus de rAAV» o «partícula viral de rAAV» se refiere a una partícula viral compuesta por al menos una proteína de la cápside de AAV y un genoma de vector rAAV encapsulado.

20 25 "Heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se compara o en la que se introduce o incorpora. Por ejemplo, un polinucleótido introducido mediante técnicas de ingeniería genética en un tipo de célula diferente es un polinucleótido heterólogo (*y*, cuando se expresa, puede codificar un polipéptido heterólogo). De manera similar, una secuencia celular (*p. ej.*, un gen o una porción del mismo) que se incorpora en un vector viral es una secuencia de nucleótidos heteróloga con respecto al vector.

30 35 El término "transgén" se refiere a un polinucleótido que se introduce en una célula y es capaz de transcribirse en ARN *y*, opcionalmente, traducirse *y/o* expresarse en condiciones apropiadas. En algunos aspectos, confiere una propiedad deseada a una célula en la que se introdujo, o de otro modo conduce a un resultado terapéutico o diagnóstico deseado. En otro aspecto, se puede transcribir en una molécula que medie en la interferencia de ARN, tal como miARN, ARNip o ARNhC.

40 45 Las expresiones "partículas del genoma (gp)", "equivalentes del genoma" o "copias del genoma", tal como se utilizan en referencia a un título viral, se refieren al número de viriones que contienen el genoma de ADN de AAV recombinante, independientemente de la infectividad o funcionalidad. El número de partículas del genoma en una preparación de vector particular puede medirse mediante procedimientos como los descritos en los Ejemplos de esta memoria o, por ejemplo, en Clark et al. (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6:272-278.

50 55 La expresión "genoma de vector (vg)", tal como se utiliza en esta memoria, puede referirse a uno o más polinucleótidos que comprenden un conjunto de secuencias de polinucleótidos de un vector, *p. ej.*, un vector viral. Un genoma de vector se puede encapsular en una partícula viral. Dependiendo del vector viral particular, un genoma de vector puede comprender ADN de cadena sencilla, ADN de doble cadena o ARN de cadena sencilla o ARN de doble cadena. Un genoma de vector puede incluir secuencias endógenas asociadas con un vector viral particular *y/o* cualesquier secuencias heterólogas insertadas en un vector viral particular mediante técnicas recombinantes. Por ejemplo, un genoma de vector AAV recombinante puede incluir al menos una secuencia de ITR que flanquea un promotor, un relleno, una secuencia de interés (*p. ej.*, un ARNi) y una secuencia de poliadenilación. Un genoma de vector completo puede incluir un conjunto completo de secuencias de polinucleótidos de un vector. En algunas realizaciones, el título de ácido nucleico de un vector viral puede medirse en términos de vg/mL. Métodos adecuados para medir este título son conocidos en la técnica (*p. ej.*, PCR cuantitativa).

60 65 Las expresiones "unidad de infección (ui)", "partícula infecciosa" o "unidad de replicación", tal como se utilizan en referencia a un título viral, se refieren al número de partículas de vector AAV recombinante infecciosas y con capacidad de replicación según lo medido por el ensayo de centro infeccioso, también conocido como ensayo de centro de replicación, tal como se describe, por ejemplo, en McLaughlin et al. (1988) J. Virol., 62:1963-1973.

70 75 La expresión "unidad transductora (tu)", tal como se utiliza en referencia a un título viral, se refiere al número de partículas de vector AAV recombinante infecciosas que dan como resultado la producción de un producto transgénico funcional según se mide en ensayos funcionales tales como los descritos en los Ejemplos de esta memoria o, por ejemplo, en Xiao et al. (1997) Exp. Neurobiol., 144:113-124; o en Fisher et al. (1996) J. Virol., 70:520-532 (ensayo LFU).

80 Una secuencia de "repetición terminal invertida" o "ITR" es una expresión bien entendida en la técnica y se refiere a secuencias relativamente cortas que se encuentran en los extremos de los genomas virales que están en orientación opuesta.

85 Una secuencia de "repetición terminal invertida (ITR) de AAV", una expresión bien entendida en la técnica, es una secuencia de aproximadamente 145 nucleótidos que está presente en ambos extremos del genoma de AAV de cadena sencilla nativo. Los 125 nucleótidos más externos de la ITR pueden estar presentes en cualquiera de dos orientaciones alternativas, lo que conduce a la heterogeneidad entre diferentes genomas de AAV y entre los dos extremos de un

solo genoma de AAV. Los 125 nucleótidos más exteriores también contiene varias regiones más cortas de auto-complementariedad (designados regiones A, A', B, B', C, C' y D), permitiendo que se produzca el apareamiento intracatenario de bases dentro de esta porción de la ITR.

5 Una "secuencia de resolución terminal" o "trs" es una secuencia en la región D de la ITR de AAV que es escindida por proteínas rep de AAV durante la replicación del ADN viral. Una secuencia de resolución terminal mutante es refractaria a la escisión por proteínas rep de AAV.

10 Un "virus auxiliar" para AAV se refiere a un virus que permite que AAV (que es un parvovirus defectuoso) sea replicado y empaquetado por una célula huésped. Se ha identificado un cierto número de estos virus auxiliares, incluyendo adenovirus, virus herpes y poxvirus tales como la vaccinia. Los adenovirus abarcan un cierto número de subgrupos diferentes, aunque el adenovirus tipo 5 del subgrupo C (Ad5) es el más comúnmente utilizado. Se conocen numerosos adenovirus de origen humano, mamífero no humano y aviar y están disponibles en depósitos tales como la ATCC. Los virus de la familia del herpes, que también están disponibles en depósitos tales como ATCC, incluyen, por ejemplo, virus del herpes simple (HSV), virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV) y virus de la pseudorrabia (PRV).

15 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a una secuencia de polipéptido o ácido nucleico de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos o nucleótidos en la secuencia del polipéptido o ácido nucleico de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar sustitución conservadora alguna como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos se puede lograr de diversas formas que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, utilizando programas de software de computadora disponibles públicamente, por ejemplo, los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1987), Sup. 30, sección 7.7.18, Tabla 7.7.1, e incluyendo el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Un ejemplo de un programa de alineamiento es ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pensilvania). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo los algoritmos necesarios para lograr el alineamiento máximo a lo largo de toda la longitud de las secuencias que se están comparando. Para los fines de esta memoria, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de la secuencia de ácido con respecto, con o contra una secuencia de aminoácidos B) se calcula de la siguiente manera: 100 veces la fracción X/Y, en donde X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias en ese alineamiento de A y B del programa, y en que Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A. Para los fines de este memoria, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico C dada con respecto, con o contra una secuencia de ácido nucleico D dada (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de ácido nucleico C dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de ácido nucleico con respecto, con o contra una secuencia de ácido nucleico D dada) se calcula de la siguiente manera: 100 veces la fracción W/Z, en que W es el número de nucleótidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias en el alineamiento del programa de C y D, y en que Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D a C.

20 Una molécula "aislada" (*p. ej.*, ácido nucleico o proteína) o célula significa que ha sido identificada y separada y/o recuperada de un componente de su entorno natural.

25 Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados, incluyendo los resultados clínicos (*p. ej.*, mejora de los síntomas, consecución de criterios de valoración clínicos y similares). Puede administrarse una cantidad eficaz en una o más administraciones. En términos de un estado patológico, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para mejorar, estabilizar o retrasar el desarrollo de una enfermedad.

30 Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Mamíferos incluyen, pero no se limitan a animales domesticados (*p. ej.*, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (*p. ej.*, primates humanos y no humanos tales como monos), conejos y roedores (*p. ej.*, ratones, y ratas). En determinadas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado estabilizado (*p. ej.*, sin empeoramiento) de la enfermedad, prevención de la propagación (*p. ej.*, metástasis) de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

- 5 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "tratamiento profiláctico" se refiere a un tratamiento en el que se sabe o se sospecha que un individuo tiene o está en riesgo de tener un trastorno, pero no ha mostrado síntomas o tiene síntomas mínimos del trastorno. Un individuo que se somete a un tratamiento profiláctico puede recibir tratamiento antes de la aparición de los síntomas.
- 10 Tal como se utiliza en esta memoria, un agente "terapéutico" (*p. ej.*, un polipéptido, ácido nucleico o transgén terapéutico) es uno que proporciona un resultado clínico beneficioso o deseado, tal como los resultados clínicos ejemplares arriba descritos. Como tal, se puede utilizar un agente terapéutico en un tratamiento tal como se describe arriba.
- 15 La expresión "retina central", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la mácula externa y/o la mácula interna y/o la fóvea. La expresión "tipos de células de la retina central", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a tipos de células de la retina central, tales como, por ejemplo, RPE y células fotorreceptoras.
- 20 15 El término "mácula" se refiere a una región de la retina central en primates que contiene una mayor concentración relativa de células fotorreceptoras, específicamente bastones y conos, en comparación con la retina periférica. La expresión "mácula externa", tal como se utiliza en esta memoria, también puede denominarse "mácula periférica". La expresión "mácula interna", tal como se utiliza en esta memoria, también puede denominarse "mácula central".
- 25 20 El término "fóvea" se refiere a una pequeña región en la retina central de primates de aproximadamente igual o menos de 0,5 mm de diámetro que contiene una mayor concentración relativa de células fotorreceptoras, específicamente conos, en comparación con la retina periférica y la mácula.
- 30 25 La expresión "espacio subretiniano", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a la ubicación en la retina entre las células fotorreceptoras y las células del epitelio pigmentario de la retina. El espacio subretiniano puede ser un espacio potencial, tal como antes de cualquier inyección subretiniana de fluido. El espacio subretiniano también puede contener un fluido que se inyecta en el espacio potencial. En este caso, el fluido está "en contacto con el espacio subretiniano". Las células que están "en contacto con el espacio subretiniano" incluyen las células que bordean el espacio subretiniano, tales como RPE y células fotorreceptoras.
- 35 30 El término "ampolla", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un espacio de fluido dentro del espacio subretiniano de un ojo. Una ampolla de la divulgación puede crearse mediante una sola inyección de fluido en un solo espacio, mediante múltiples inyecciones de uno o más fluidos en el mismo espacio, o mediante múltiples inyecciones en múltiples espacios, que cuando se reposicionan crean un espacio total de fluidos útil para lograr un efecto terapéutico sobre la porción deseada del espacio subretiniano.
- 40 35 "Promotor de rodopsina quinasa (RK)" se refiere a una secuencia de polinucleótidos derivada de un gen de rodopsina quinasa (*p. ej.*, RK humana, representado por GenBank Entrez Gene ID 6011) que impulsa la expresión específicamente en células fotorreceptoras de bastones y conos, así como en líneas celulares de la retina, tales como WERI Rb-1. Tal como se utiliza en esta memoria, "promotor de rodopsina quinasa" puede referirse a una secuencia de promotor completa o un fragmento de la secuencia de promotor suficiente para impulsar la expresión específica para el fotorreceptor, tal como las secuencias descritas en Khani, S.C., et al. (2007) *Invertir. Ophahlmol. Vis. Sci.* 48(9):3954-61 y Young, J.E., et al. (2003) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44(9):4076-85. En algunas realizaciones, el promotor de RK se extiende desde -112 hasta +180 con respecto al sitio de inicio de la transcripción.
- 45 40 «Promotor de β-actina de pollo» se refiere a una secuencia de polinucleótidos derivada de un gen de β-actina de pollo (*p. ej.*, beta-actina de *Gallus gallus*, representada por GenBank Entrez Gene ID 396526). Tal como se utiliza en esta memoria, "promotor de β-actina de pollo" puede referirse a un promotor que contiene un elemento potenciador temprano de citomegalovirus (CMV), el promotor y el primer exón e intrón del gen de β-actina de pollo, y el acceptor de corte y empalme del gen beta-globina, tal como las secuencias descritas en Miyazaki, J., et al. (1989) *Gene* 79(2):269-77. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "promotor de CAG" se puede utilizar indistintamente. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "potenciador temprano de CMV/promotor de beta actina de pollo (CAG)" puede utilizarse indistintamente.
- 50 45 55 La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en esta memoria incluye (y describe) realizaciones que están dirigidas a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".
- 60 55 Tal como se utiliza en esta memoria, la forma en singular de los artículos "un", "una" y "el", "la" incluye referencias en plural, a menos que se indique lo contrario.
- 65 60 Se entiende que los aspectos y realizaciones de la invención descritos en esta memoria incluyen aspectos y realizaciones "que comprende", "que consiste" y/o "que consiste esencialmente en".
- III. Partículas virales**

Se sabe en la técnica que el proteoglicano de heparán sulfato (HSPG) actúa como el receptor celular para partículas de AAV2 (Summerford, C. y Samulski, R.J. (1998) J. Virol. 72(2):1438-45). La unión entre una partícula de AAV2 y HSPG en la membrana celular sirve para fijar la partícula a la célula. Otras proteínas de la superficie celular, tales como el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos y la integrina $\alpha v\beta 5$, también pueden facilitar la infección celular. Después de unirse, una partícula de AAV2 puede penetrar en la célula a través de mecanismos que incluyen endocitosis mediada por receptores a través de cavidades recubiertas de clatrina. Una partícula de AAV2 puede liberarse de una vesícula endocítica tras la acidificación endosomal. Esto permite que la partícula de AAV2 viaje a la región perinuclear y luego al núcleo de la célula. También se sabe que las partículas de AAV3 se unen a heparán (Rabinowitz, J.E., et al. (2002) J. Virol. 76(2):791-801).

Los protocolos de terapia génica para trastornos del ojo requieren el suministro localizado del vector a las células del ojo (*p. ej.*, células de la retina). Las células que serán el objetivo del tratamiento en estas enfermedades pueden incluir, *inter alia*, una o más células del ojo (*p. ej.*, fotorreceptores, neuronas oculares, etc.). Los métodos y kits de la invención se basan, al menos en parte, en el descubrimiento de que las cápsides específicas para rAAV (*p. ej.*, aquellas que comprenden una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato) permiten una amplia distribución del vector entre las células del ojo. Como tales, estas cápsides pueden ser particularmente ventajosas para el suministro de un ácido nucleico heterólogo al ojo de un individuo, mejorando la transducción de rAAV de las células después del suministro de una partícula de rAAV al ojo de un individuo, mejorando la expresión de un ácido nucleico heterólogo después del suministro de partículas de rAAV al ojo de un individuo y/o tratamiento de un trastorno del ojo de un individuo utilizando partículas de rAAV.

De igual manera, los protocolos de terapia génica para trastornos del SNC requieren el suministro localizado del vector a las células en el SNC. Las células que serán el objetivo del tratamiento en estas enfermedades pueden incluir, *inter alia*, una o más células del ojo (*p. ej.*, neuronas). Los métodos de la divulgación se basan, al menos en parte, en el descubrimiento de que cápsides específicas para rAAV (*p. ej.*, aquellas que comprenden una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato) permiten una amplia distribución del vector entre las células del SNC. Como tales, estas cápsides pueden ser particularmente ventajosas para el suministro de un ácido nucleico heterólogo al sistema nervioso central (SNC) de un individuo, mejorando la transducción de rAAV de las células después del suministro de una partícula de rAAV al SNC de un individuo, mejorando la expresión de un ácido nucleico heterólogo después del suministro de partículas de rAAV al SNC de un individuo y/o el tratamiento de un trastorno del SNC de un individuo utilizando partículas de rAAV.

Se sabe que la cápside de AAV (*p. ej.*, AAV2, AAVrh8R, etc.) incluye tres proteínas de la cápside: VP1, VP2 y VP3. Estas proteínas contienen cantidades significativas de secuencias de aminoácidos solapantes y secuencias N-terminales únicas. Una cápside de AAV2 incluye 60 subunidades dispuestas por simetría icosaédrica (Xie, Q., et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. 99(16):10405-10). Se ha encontrado que VP1, VP2 y VP3 están presentes en una relación de 1:1:10.

Se sabe que la unión entre las proteínas de la cápside de AAV2 y HSPG se produce a través de interacciones electrostáticas entre los residuos básicos de la proteína de la cápside de AAV2 y los residuos de glucosaminoglicanos cargados negativamente (Opie, SR et al., (2003) J. Virol. 77:6995-7006; Kern, A et al., (2003) J. Virol. 77:11072-11081). Residuos de la cápside específicos implicados en estas interacciones incluyen R484, R487, K532, R585 y R588. Se ha demostrado que mutaciones en estos residuos reducen la unión de AAV2 a las células Hela y al propio heparán (Opie, SR et al., (2003) J. Virol. 77:6995-7006; Kern, A et al., (2003) J. Virol. 77:11072-11081; documento WO 2004/027019 A2, Patente de EE.UU. Nº 7.629.322). Además, sin desechar estar ligado a la teoría, se cree que la o las sustituciones de aminoácidos en uno o más de los residuos correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 532, 585 o 588, la numeración basada en la numeración VP1 de AAV2 puede modular las propiedades de transducción de los tipos de cápside de AAV que no se unen a HSPG, o pueden modular las propiedades de transducción de los tipos de cápside de AAV independientemente de su capacidad para unirse a HSPG.

En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato. En la invención, la partícula de rAAV comprende una cápside de serotipo 2 de AAV (AAV2). En algunos casos, la partícula de rAAV de la divulgación comprende una cápside de serotipo rh8R de AAV (AAVrh8R).

Tal como se describe en esta memoria, partículas de rAAV con mutaciones en las proteínas de la cápside en los residuos que interactúan con HSPG o en uno o más de los residuos correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2, muestran propiedades ventajosas, tales como expresión potenciada y/o neuroinflamación reducida. Por consiguiente, en algunas realizaciones, tras el suministro, el ácido nucleico heterólogo codificado por el vector rAAV se expresa a un nivel incrementado, en comparación con el nivel de expresión de un ácido nucleico heterólogo de una partícula de rAAV que comprende una cápside de rAAV que comprende un rAAV de referencia. proteína de la cápside (*p. ej.*, una proteína de la cápside de rAAV de tipo

salvaje). En algunas realizaciones, la expresión del ácido nucleico se incrementa en al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 25%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 75% o al menos aproximadamente un 100%. En algunos casos, tras el suministro, la partícula de rAAV provoca una neuroinflamación reducida, en comparación con una partícula de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV de referencia (*p. ej.*, una proteína de la cápside de rAAV de tipo salvaje). En algunos casos, la neuroinflamación se reduce en al menos aproximadamente un 10%, al menos aproximadamente un 25%, al menos aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 75% o al menos aproximadamente un 100%. Una proteína de la cápside de rAAV de referencia adecuada puede incluir cualquier proteína de la cápside que carece de una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato (la cápside de referencia puede contener una o más sustituciones de "fondo" que no alteran la unión a HSPG).

En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para suministrar un ácido nucleico heterólogos al ojo de un individuo, que comprenden administrar una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) al espacio subretinal del individuo, en donde la partícula de rAAV comprende a) una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato, y b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogos y al menos una repetición terminal invertida de AAV.

En la invención, la partícula de rAAV comprende una cápside de serotipo 2 de AAV (AAV2). En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de una cualquiera de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV2, en donde las sustituciones de amino alteran la interacción de la partícula de rAAV con HSPG (*p. ej.*, reducir o eliminar la unión a HSPG). En la invención, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de VP2 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de VP3 de AAV2. En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de la combinación de VP1, VP2 y VP3 de AAV2. En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de cualquiera de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV2. En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de una cualquiera de las proteínas de la cápside de SEQ ID NO: 1, 3 y/o 5. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV de la invención comprenden proteínas de la cápside de SEQ. ID NO: 2, 4 y/o 6.

En algunos casos, la partícula rAAV de la divulgación comprende una cápside de serotipo 3 de AAV (AAV3). En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de una cualquiera de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV3, en donde las sustituciones de amino alteran la interacción de la partícula de rAAV con HSPG (*p. ej.*, reducir o eliminar la unión a HSPG). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de VP1 de AAV3. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de VP2 de AAV3. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de VP3 de AAV3. En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de la combinación de VP1, VP2 y VP3 de AAV3. En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de cualquiera de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV3. En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos correspondiente a la proteína de la cápside de SEQ ID NO: 7.

En algunos casos, la partícula de rAAV de la divulgación comprende una cápside de serotipo rh8R de AAV (AAVrh8R), *p. ej.*, en la Publicación de EE.UU. PG. N°. 20090317417. En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de una cualquiera de VP1, VP2 y/o VP3 de AAVrh8R, en donde las sustituciones de amino alteran la interacción de la partícula de rAAV con HSPG (*p. ej.*, reducen o eliminan la unión a HSPG). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de VP2 de AAVrh8R. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de VP3 de AAVrh8R. En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de la combinación de VP1, VP2 y VP3 de AAVrh8R. En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de cualquiera de VP1, VP2 y/o VP3 de AAVrh8R. En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de la proteína de la cápside exemplificada por SEQ ID NO: 9. En algunos casos, las partículas de rAAV de la divulgación comprenden proteínas de la cápside de SEQ. ID NOs: 10 y/u 11.

En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos reducen la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos un 100%. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos reducen la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 15%, aproximadamente al menos un 20%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 30%, aproximadamente al menos un 35%, aproximadamente al menos un 40%, aproximadamente al menos un 45%,

aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 55%, aproximadamente al menos un 60%,
 5 aproximadamente al menos un 65%, aproximadamente al menos un 70%, aproximadamente al menos un 75%,
 aproximadamente al menos un 80%, aproximadamente al menos un 85%, aproximadamente al menos un 90%,
 10 aproximadamente al menos un 95% o aproximadamente al menos el 100% (en comparación con la unión de una
 particula de rAAV que comprende una cápside de tipo salvaje). En algunas realizaciones, la una o más sustituciones
 15 de aminoácidos reducen la unión de la particula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en uno cualquiera de
 aproximadamente 10% a aproximadamente 100%, aproximadamente 20% a aproximadamente 100%,
 20 aproximadamente 30% a aproximadamente 100%, aproximadamente 40% a aproximadamente 100%,
 25 aproximadamente 50% a aproximadamente 100%, aproximadamente 60% a aproximadamente 100%,
 30 aproximadamente 70% a aproximadamente 100%, aproximadamente 80% a aproximadamente 100%,
 35 aproximadamente 90% a aproximadamente 100%, aproximadamente 10 % a aproximadamente 90%,
 40 aproximadamente 20% a aproximadamente 90%, aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, aproximadamente
 45 40% a aproximadamente 90%, aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, aproximadamente 60% a
 50 aproximadamente 90%, aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, aproximadamente 80% a aproximadamente
 55 90%, aproximadamente 10% a aproximadamente 80%, aproximadamente 20% a aproximadamente 80%,
 60 aproximadamente 30% a aproximadamente 80%, aproximadamente 40% a aproximadamente 80%, aproximadamente
 65 50% a aproximadamente 80%, aproximadamente 60% a aproximadamente 80%, aproximadamente 70% a
 70 aproximadamente 80%, aproximadamente 10% a aproximadamente 70%, aproximadamente 20% a aproximadamente
 75 50%, aproximadamente 30% a aproximadamente 50%, aproximadamente 40% a aproximadamente 50%, aproximadamente
 80 10% a aproximadamente 40%, aproximadamente 20% a aproximadamente 40%, aproximadamente 30% a
 85 aproximadamente 40%, aproximadamente 10% a aproximadamente 30%, aproximadamente 20% a aproximadamente
 90 30%, aproximadamente 10% a aproximadamente 20% (en comparación con la unión de una particula de rAAV que
 comprende una cápside de tipo salvaje). En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos resulta
 en una unión no detectable de la particula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en comparación con la unión
 de una particula de rAAV de tipo salvaje. Se conocen en la técnica medios para medir la unión de partículas de AAV
 a HSPG; *p. ej.*, la unión a un medio de cromatografía de heparán sulfato o la unión a una célula que se sabe que
 expresa HSPG en su superficie. Por ejemplo, véase Opie, SR et al., (2003) J. Virol. 77:6995-7006 y Kern, A et al.,
 (2003) J. Virol. 77:11072-11081.

En algunos casos, la divulgación proporciona partículas de rAAV para el suministro subretiniano de un ácido nucleico terapéutico, en donde las partículas de rAAV comprenden una o más sustituciones de aminoácidos de proteínas de la cápside que reducen o eliminan la unión de la particula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato, en donde la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 532, 585 o 588 de VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 532, 585 o 588 de VP2 de AAV2, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 532, 585 o 588 de VP3 de AAV2, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 532, 585 o 588 de VP1 de AAV2, VP2 de AAV2 y/o VP3 de AAV2, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la VP1 de rAAV2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 532, 585 o 588 de VP1 de AAV3, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 532, 585 o 588 de VP2 de AAV3, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 532, 585 o 588 de VP3 de AAV3, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 532, 585 o 588 de VP1 de AAV3, VP2 de AAV3 y/o VP3 de AAV3, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la VP1 de rAAV2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

En algunos casos, las partículas de AAV de la divulgación comprenden una cápside con una o más sustituciones de aminoácidos en la posición 485, 488, 528, 533, 586 o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAVrh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente. En algunos casos, el residuo de aminoácido cargado positivamente se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En otros casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En algunos casos, un residuo de aminoácido hidrófobo se sustituye con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En casos adicionales, la sustitución de uno o más aminoácidos comprende la

- 5 sustitución de un residuo de alanina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R533 y/o A586, numeración basada en VP1 de AAVrh8R. En casos adicionales, la cápside de AAV comprende sustituciones de aminoácidos A586R y/o R533A, numeración basada en VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside de rAAV de SEQ ID NOs: 10 y/u 11.
- 10 En algunos casos de la divulgación, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución de un residuo de aminoácido cargado positivamente (*p. ej.*, un aminoácido con una cadena lateral cargada positivamente) con un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente (*p. ej.*, un aminoácido que no contiene una cadena lateral cargada positivamente). Los aminoácidos cargados positivamente incluyen arginina, histidina y lisina. Ejemplos 15 de residuos de aminoácidos que no están cargados positivamente incluyen aminoácidos cargados negativamente (ácido aspártico y ácido glutámico), aminoácidos con cadenas laterales polares sin carga (serina, treonina, asparagina y glutamina), aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas (alanina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina y triptófano), glicina, cisteína y prolina. En algunos casos, el uno o más residuos de aminoácidos 20 cargados positivamente de la cápside de AAV se sustituye con un residuo de aminoácido hidrófobo. En algunas realizaciones, una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina. En realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina. En otros casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden 25 una sustitución de un residuo de aminoácido que no está cargado positivamente con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En algunos casos, un residuo de aminoácido hidrófobo se sustituye con un residuo de aminoácido cargado positivamente. En casos adicionales, la sustitución de uno o más aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de alanina. En aún realizaciones adicionales, la una o más sustituciones de aminoácidos comprende la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina.
- 30 En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588 de VP1, VP2 y/o VP3, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588 de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV2, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la una o más 35 sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R484, R487, K527, K532 y/o R588 de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV2, numeración basada en SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una o más sustituciones en R484A, R487A, R585A y/o R588A de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV2, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588 de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV3, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una o más de las sustituciones en R484A, R487A, R585A y/o R588A de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV3, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende proteínas de la 40 cápside de rAAV de SEQ ID NOs: 2, 4 y/o 6.
- 45 En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R485, R488, R533, A586 y/o T589 de VP1, VP2 y/o VP3, numeración basada en VP1 de AAVrh8R. En algunas casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición R485, R488, R533, A586 y/o T589 de VP1, VP2 y/o VP3, numeración basada en VP1 de AAVrh8R, numeración basada en SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una o más de las sustituciones en R533A y/o A586R de VP1, VP2 y/o VP3 de AAV2, numeración basada en VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside de rAAV de SEQ ID NOs: 10 y/u 11.
- 50 En algunos casos, la cápside de AAV comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con HSPG. En la invención, la cápside de AAV comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que reduce o elimina la unión a HSPG. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión a HSPG. En algunas realizaciones, la cápside de AAV tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez sustituciones de aminoácidos que reducen o eliminan la unión a HSPG. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones en las posiciones R484 y R487, numeración basada en VP1 de rAAV2. 55 En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones en la posición en R484 y R487, numeración basada en VP1 de rAAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones en las posiciones R585 y R588, numeración basada en VP1 de rAAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones en la posición en R585 y R588, numeración basada en VP1 de rAAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones en R484A y R487A, numeración basada en VP1 de rAAV2. En algunas 60 realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones en R484A y R487A, numeración basada en VP1 de rAAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones en R585A y R588A, numeración basada en VP1 de rAAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones en R585A y R588A, numeración basada en VP1 de rAAV2.
- 65 Se sabe que los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) se expresan en muchos tejidos por todo el cuerpo y desempeñan funciones importantes en la matriz extracelular, la adhesión celular y la señalización celular.

En algunos casos, la divulgación proporciona partículas de rAAV para el suministro al SNC de un ácido nucleico terapéutico, en donde las partículas de rAAV comprenden una o más sustituciones de aminoácidos de proteínas de la cápside que reducen o eliminan la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato. En algunos casos,

5 la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 347, 350, 390, 395, 448, 451, 484, 487, 527, 532, 585 y/o 588, numeración basada en VP1 de AAV2. Tal como se utiliza en esta memoria, "numeración basada en VP1 de AAV2" se refiere al aminoácido de la proteína de la cápside mencionada correspondiente al aminoácido mencionado de VP1 de AAV2. Por ejemplo, si una o más sustituciones de aminoácidos están en la posición 347, 350, 390, 395, 448, 451, 484, 487, 527, 532, 585 y/o 588, numeración basada en VP1 de AAV2, entonces la una o más sustituciones de aminoácidos están en el o los aminoácidos de la proteína de la cápside mencionada correspondiente a los aminoácidos 347, 350, 390, 395, 448, 451, 484, 487, 527, 532, 585 y/o 588 de VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos está en una posición R347, R350, K390, K395, R448, R451, R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 532, 585 o 588 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos está en la posición 484, 487, 532, 585 o 588 de VP1 de AAV2, VP2 de AAV2 y/o VP3 de AAV2, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la VP1 de AAV2 (p. ej., rAAV2) comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

20 En la invención, la cápside de AAV comprende una o más sustituciones en las posiciones R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en VP1 de rAAV2. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV de la invención comprenden proteínas de la cápside de SEQ. ID NOS: 2, 4 y/o 6. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones en las posiciones R484 y R487 o R585 y R588, numeración basada en VP1 de rAAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones en R484A y R487A o sustituciones en R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende sustituciones de aminoácidos en R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV comprende la sustitución de aminoácidos en K532A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones en R347A, R350A, K390A, K395A, R448A, R451A, R484A, R487A, K527A, K532A, R585A y/o R588A, numeración basada en VP1 de AAV2.

25 30 En algunos casos, la divulgación proporciona partículas de rAAV para el suministro al SNC de un ácido nucleico terapéutico, en donde las partículas de rAAV comprenden una o más sustituciones de aminoácidos de proteínas de la cápside que reducen o eliminan la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato. En algunos casos, la partícula de rAAV de la divulgación comprende una cápside de serotipo rh8R de AAV (AAVrh8R), p. ej., en la Publicación de EE.UU. PG. Nº. 20090317417. En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de una cualquiera de VP1, VP2 y/o VP3 de AAVrh8R, en donde las sustituciones de aminoácidos alteran la interacción de la partícula de rAAV con HSPG (p. ej., reducir o eliminar la unión a HSPG). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de VP2 de AAVrh8R. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de VP3 de AAVrh8R. En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de la combinación de VP1, VP2 y VP3 de AAVrh8R. En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de cualquiera de VP1, VP2 y/o VP3 de AAVrh8R. En algunos casos, una o más sustituciones de aminoácidos son sustituciones de residuos de aminoácidos de la proteína de la cápside exemplificada por SEQ ID NO: 9. En algunos casos, las partículas de rAAV de la divulgación comprenden proteínas de la cápside de SEQ. ID NOS: 10 y/u 11.

35 40 45 En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de serotipo rh8R de AAV (AAVrh8R). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos están en la posición 586 y/o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAVrh8R que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición A586 y/o T589, numeración basada en VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución A586R, numeración basada en VP1 de AAVrh8R. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución T589R o T589K, numeración basada en VP1 de AAVrh8R.

50 55 60 65 70 Como se ha comentado arriba, sin desear estar ligado a la teoría, se cree que la o las sustituciones de aminoácidos en uno o más de los residuos correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 532, 585 o 588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2 puede modular las propiedades de transducción de los tipos de cápside de AAV que no se unen a HSPG, o pueden modular las propiedades de transducción de los tipos de cápside de AAV independientemente de su capacidad para unirse a HSPG. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden uno o más aminoácidos correspondientes a un aminoácido mostrado en la FIG. 20. Por ejemplo, en algunos casos, uno o más aminoácidos en la o las posiciones correspondientes a los aminoácidos 585 y/o 588 (numeración basada en VP1 de AAV2) se reemplazan por residuos de arginina (p. ej., S586 y/o T589 para AAV1 o AAV6; S586 y/o A589 para AAV9; A586 y/o T589 para AAVrh8R; Q588 y/o T591 para AAV8; y Q588 y/o A591 para AAVrh10). Estas cápsides modificadas pueden encontrara uso, *inter alia*, para mejorar la transducción intravítreo que fija como objetivo la retina. En otros casos, uno o más aminoácidos (p. ej., arginina o lisina) en la o las posiciones

correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 527 y/o 532 (numeración basada en VP1 de AAV2) se reemplazan por un aminoácido o aminoácidos con carga no positiva, tales como alanina (p. ej., R485, R488, K528 y/o K533 para AAV1 o AAV6; R485, R488, K528 y/o R533 para AAV9 o AAVrh8R; y R487, R490, K530 y/o R535 para AAV8 o AAVrh10). Estas cápsides modificadas pueden encontrarse uso, *inter alia*, para mejorar la transducción subretiniana o del SNC.

- 5 En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV serotipo 1 (AAV1). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos están en la posición 586 y/o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAV1. En algunos casos, la VP1 de AAV1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición S586 y/o T589, numeración basada en VP1 de AAV1. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución S586R o S586K, numeración basada en VP1 de AAV1. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución T589R, numeración basada en VP1 de AAV1. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV serotipo 6 (AAV6). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos están en la posición 586 y/o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAV6. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAV6 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición S586 y/o T589, numeración basada en VP1 de AAV6. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución S586R o S586K, numeración basada en VP1 de AAV6. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución T589R, numeración basada en VP1 de AAV6. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV serotipo 8 (AAV8). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos están en la posición 588 y/o 591, numeración basada en la numeración VP1 de AAV8. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAV8 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición Q588 y/o T591, numeración basada en VP1 de AAV8. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución Q588R o Q588K, numeración basada en VP1 de AAV8. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución T591R, numeración basada en VP1 de AAV8. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV serotipo 9 (AAV9). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos están en la posición 586 y/o 589, numeración basada en la numeración VP1 de AAV9. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAV9 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición S586 y/o A589, numeración basada en VP1 de AAV9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución S586R o S586K, numeración basada en VP1 de AAV9. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución A589R o A589K, numeración basada en VP1 de AAV9. En algunos casos, la partícula de rAAV comprende una cápside de serotipo rh10 de AAV (AAVrh10). En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos están en la posición 588 y/o 591, numeración basada en la numeración VP1 de AAVrh10. En algunos casos, la numeración se basa en la VP1 de AAVrh10 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución en la posición Q588 y/o A591, numeración basada en VP1 de AAVrh10. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución Q588R o Q588K, numeración basada en VP1 de AAVrh10. En algunos casos, la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución A591R, numeración basada en VP1 de AAVrh10.

IV. Métodos de Tratamiento

- 45 Los protocolos de terapia génica para enfermedades de la retina, tales como LCA, retinitis pigmentosa y degeneración macular relacionada con la edad, requieren el suministro localizado del vector a las células en la retina. Las células que serán el objetivo del tratamiento en estas enfermedades son las células fotorreceptoras en la retina o las células del RPE subyacentes a la retina neurosensorial. Suministrar vectores de terapia génica a estas células requiere una inyección en el espacio subretiniano entre la retina y el RPE. En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para suministrar vectores de terapia génica de rAAV a células de la retina, en que los vectores rAAV están encapsulados en una cápside de AAV que comprende sustituciones de uno o más residuos de aminoácidos que interactúan con HSPG.
- 55 En algunos casos, la divulgación proporciona métodos para tratar un trastorno del SNC en un individuo, que comprenden el suministro de una composición que comprende partículas de rAAV al SNC del individuo, en donde las partículas de rAAV comprenden (a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato, y (b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV. En algunas realizaciones, el individuo es un ser humano.

Vectores terapéuticos

- 60 La divulgación proporciona métodos de terapia génica para trastornos oculares, en los que las partículas de rAAV que comprenden vectores terapéuticos se suministran a la retina de un individuo. Una transducción mejorada de las células de la retina se puede conseguir encapsulando los vectores rAAV en cápsides de rAAV (p. ej., partículas de rAAV2, rAAVrh8R, etc.), en que uno o más aminoácidos de la cápside que interactúan con HSPG están sustituidos de tal

manera que la unión de las partículas de rAAV a HSPG se reduce o elimina. El vector puede comprender un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido (*p. ej.*, un polipéptido terapéutico o de diagnóstico) y/o un ácido nucleico terapéutico. El ácido nucleico que codifica polipéptidos terapéuticos o de diagnóstico y/o ácido nucleico terapéutico se puede generar utilizando métodos conocidos en la técnica, utilizando síntesis estándares y métodos recombinantes.

5 En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido terapéutico. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido de diagnóstico. Ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos terapéuticos incluyen: ácidos nucleicos para el reemplazo de un gen ausente o mutado que se sabe que provoca una enfermedad retiniana, por ejemplo, *Prph2*, *RPE65*, *MERTK*, *RPGR*, *RP2*, *RPGRI*, *CNGA3*, *CNGB3*, y *GNAT2*. Otros ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos terapéuticos incluyen los que codifican factores neurotróficos (tales como *GDNF*, *CNTF*, *FGF2*, *PEDF*, *EPO*), genes antiapoptóticos (tales como *BCL2*, *BCL-X*, *NFkB*), factores antiangiogénicos (tales como *Endostatina*, *Angiostatina*, *sFlt*) y factores antiinflamatorios (tales como *IL10*, *IL1-ra*, *TGFβ*, *IL4*). Otros polipéptidos terapéuticos para trastornos oculares incluyen, pero no se limitan a *Myo7a*, *ABCA4*, *REP1*, *GUCY2D*, *PDE6C*, *RS1*, *RPGRI*, *Lpcat1*, *AIPL1*, *RDH12*, *CHM*. En algunas realizaciones, el polipéptido codificado es la variante humana del polipéptido.

10 15 Los ácidos nucleicos de la divulgación pueden codificar polipéptidos que son proteínas intracelulares, anclados en la membrana celular, permanecen dentro de la célula o son secretados por la célula transducida con los vectores de la invención. Para polipéptidos secretados por la célula que recibe el vector; el polipéptido puede ser soluble (*es decir*, no fijado a la célula). Por ejemplo, los polipéptidos solubles carecen de una región transmembrana y son secretados de la célula. Se conocen en la técnica técnicas para identificar y eliminar secuencias de ácido nucleico que codifican dominios transmembrana.

20 25 Los vectores que pueden administrarse de acuerdo con la presente invención también incluyen vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica un ARN (*p. ej.*, ARNi, ribozimas, miARN, ARNip, ARN antisentido) que cuando se transcribe a partir de los ácidos nucleicos del vector puede tratar una trastorno ocular al interferir con la traducción o transcripción de una proteína anormal o en exceso asociada con un estado patológico de la divulgación. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de la divulgación pueden codificar un ARN que trata una enfermedad mediante la eliminación o reducción altamente específica de ARNm que codifica las proteínas anormales y/o en exceso. Las secuencias de ARN terapéutico incluyen ARNi, ARN inhibidor pequeño (ARNip), micro ARN (miARN) y/o ribozimas (tales como las ribozimas de cabeza de martillo y de horquilla) que pueden tratar enfermedades mediante la eliminación o reducción altamente específica de ARNm que codifica la anomalía y/o las proteínas en exceso, tales como las que se presentan en diversas formas de degeneración retiniana hereditaria. Ejemplos no limitantes de trastornos oculares que pueden tratarse mediante secuencias de ARN terapéuticas incluyen, por ejemplo, retinitis pigmentosa autosómica dominante (ADRP) y retinopatía diabética. Ejemplos de secuencias de ARN terapéutico y ácidos nucleicos que codifican estas secuencias que pueden utilizarse en la invención incluyen las descritas, por ejemplo, en la Pat. de EE.UU. N°. 6.225.291. En algunas realizaciones, la secuencia de ARN terapéutico es miR-708. En algunas realizaciones, la miR-708 se utiliza en combinación con un ácido nucleico que codifica una rodopsina de tipo salvaje, ya sea como parte del mismo vector rAAV o como parte de un segundo vector rAAV. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica la rodopsina de tipo salvaje carece de la secuencia diana de miR-708 ubicada en la región 3' no traducida del gen rodopsina. Vectores rAAV que codifican miR-708 y/o rodopsina son proporcionados por la Solicitud de Patente Provisional de EE.UU. N° de Serie.61/969.027.

30 35 40 Determinados casos de la divulgación se refieren al uso de partículas de rAAV (*p. ej.*, un vector terapéutico) que comprenden (a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato, y (b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico. Tal como se utiliza en esta memoria, un ácido nucleico terapéutico puede expresar cualquier ácido nucleico terapéutico de la presente divulgación o cualquier ácido nucleico que codifique un polipéptido terapéutico de la presente divulgación. Se puede utilizar un ácido nucleico terapéutico, por ejemplo, para mejorar un síntoma, prevenir o retrasar la progresión y/o proporcionar un tratamiento de un trastorno (*p. ej.*, un trastorno descrito en esta memoria).

50 55 60 Una transducción mejorada de las células del SNC se puede conseguir encapsidando los vectores rAAV en cápsides de rAAV (*p. ej.*, partículas de rAAV2, rAAVrh8R, etc.), en que uno o más aminoácidos de la cápside que interactúan con HSPG están sustituidos de tal manera que la unión de las partículas de rAAV a HSPG se reduce o elimina. El vector puede comprender un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido (*p. ej.*, un polipéptido terapéutico o de diagnóstico) y/o un ácido nucleico terapéutico. El ácido nucleico que codifica polipéptidos terapéuticos o de diagnóstico y/o ácido nucleico terapéutico se puede generar utilizando métodos conocidos en la técnica, utilizando síntesis estándares y métodos recombinantes. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido terapéutico. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido de diagnóstico. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un gen asociado al SNC.

65 En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un ácido nucleico terapéutico. En algunas realizaciones, un ácido nucleico terapéutico puede incluir, sin limitación, un ARNip, un ARNh, un ARNi, un miARN, un ARN antisentido, una ribozima o una ADNzima. Como tal, un ácido nucleico terapéutico puede codificar un ARN que, cuando se transcribe a partir de los ácidos nucleicos del vector, puede tratar un trastorno de la divulgación (*p. ej.*, un trastorno

del SNC) al interferir con la traducción o transcripción de una proteína anormal o en exceso. asociado con un trastorno de la divulgación. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de la divulgación pueden codificar un ARN que trata un trastorno mediante la eliminación o reducción altamente específica de ARNm que codifica las proteínas anormales y/o en exceso. Secuencias de ARN terapéutico incluyen ARNi, ARN inhibidor pequeño (ARNip), micro ARN (miARN) y/o ribozimas (tales como las ribozimas de cabeza de martillo y de horquilla) que pueden tratar trastornos mediante la eliminación o reducción altamente específica de ARNm que codifica las proteínas anormales y/o en exceso.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido terapéutico. Un polipéptido terapéutico puede, *p. ej.*, suministrar un polipéptido y/o actividad enzimática que está ausente o presente a un nivel reducido en una célula u organismo. Alternativamente, un polipéptido terapéutico puede suministrar un polipéptido y/o actividad enzimática que contrarresta indirectamente un desequilibrio en una célula u organismo. Por ejemplo, un polipéptido terapéutico para un trastorno relacionado con la acumulación de un metabolito provocado por una deficiencia en una enzima o actividad metabólica puede suministrar una enzima o actividad metabólica ausente, o puede suministrar una enzima o actividad metabólica alternativa que conduce a la reducción del metabolito. También se puede utilizar un polipéptido terapéutico para reducir la actividad de un polipéptido (*p. ej.*, uno que está sobre-expresado, activado por una mutación de ganancia de función, o cuya actividad está mal regulada) actuando, *p. ej.*, como polipéptido dominante negativo.

En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un polipéptido seleccionado de una enzima, un factor neurotrófico, un polipéptido que es deficiente o está mutado en un individuo con un trastorno relacionado con el SNC, un antioxidante, un factor antiapoptótico, un factor antiangiogénico y un factor antiinflamatorio. Polipéptidos de este tipo pueden utilizarse para tratar trastornos del SNC, *p. ej.*, suministrando un polipéptido y/o una actividad enzimática que está reducida, ausente o mal regulada en un trastorno del SNC, mejorando una causa y/o un síntoma de un trastorno del SNC y/o mitigando el daño al SNC provocado por un trastorno del SNC (*p. ej.*, apoptosis, inflamación u otro tipo de muerte celular). Ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos terapéuticos incluyen: ácidos nucleicos para el reemplazo de un gen ausente o mutado que se sabe que provoca un trastorno del SNC, por ejemplo, *Prph2*, *RPE65*, *MERTK*, *RPGR*, *RP2*, *RPGRIP*, *CNGA3*, *CNGB3*, y *GNAT2*. Otros ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos terapéuticos incluyen los que codifican factores neurotróficos (tales como *GDNF*, *CNTF*, *FGF2*, *PEDF*, *EPO*), genes antiapoptóticos (tales como *BCL2*, *BCL-X*, *NFKB*), factores antiangiogénicos (tales como *Endostatina*, *Angiostatina*, *sFlt*) y factores antiinflamatorios (tales como *IL10*, *IL1-ra*, *TGF β* , *IL4*). Otros polipéptidos terapéuticos para trastornos del SNC incluyen, pero no se limitan a *Myo7a*, *ABCA4*, *REP1*, *GUCY2D*, *PDE6C*, *RS1*, *RPGRIP*, *Lpcat1*, *AIPL1*, *RDH12*, *CHM*. En algunas realizaciones, el polipéptido codificado es la variante humana del polipéptido. En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo codifica una proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), tirosina hidroxilasa (TH), GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), aminoácido descarboxilasa (AACD), un antioxidante, un polipéptido antiangiogénico, un polipéptido antiinflamatorio y/o aspartoacilasa (ASPA). Ejemplos de antioxidantes incluyen, sin limitación, *SOD1*; *SOD2*; Catalasa; *Sirtuins 1, 3, 4 o 5*; *NRF2*; *PGC1a*; *GCL* (subunidad catalítica); *GCL* (subunidad modificadora); adiponectina; glutatión peroxidasa 1; y neuroglobina. Ejemplos de polipéptidos antiangiogénicos incluyen, sin limitación, angiostatina, endostatina, PEDF, un receptor de VEGF soluble y un receptor de PDGF soluble. Ejemplos de polipéptidos antiinflamatorios incluyen, sin limitación, *IL-10*, *IL17R* soluble, *TNF-R* soluble, *TNF-R-Ig*, un inhibidor de *IL-1* y un inhibidor de *IL18*. Otros polipéptidos ejemplares de estas clases que pueden utilizarse para tratar un trastorno del SNC se proporcionan *infra*.

Los ácidos nucleicos de la divulgación pueden codificar polipéptidos que son proteínas intracelulares, anclados en la membrana celular, permanecen dentro de la célula o son secretados por la célula transducida con los vectores de la divulgación. Para polipéptidos secretados por la célula que recibe el vector; el polipéptido puede ser soluble (*es decir*, no fijado a la célula). Por ejemplo, los polipéptidos solubles carecen de una región transmembrana y son secretados de la célula. Se conocen en la técnica técnicas para identificar y eliminar secuencias de ácido nucleico que codifican dominios transmembrana.

En algunas realizaciones, el ácido nucleico heterólogo está enlazado operativamente a un promotor. Promotores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), el RSV LTR, el MoMLV LTR, el promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un promotor del virus simio 40 (SV40) y un promotor de CK6, un promotor de transtiretina (TTR), un promotor de TK, un promotor de respuesta a tetraciclina (TRE), un promotor de VHB, un promotor de hAA T, un promotor de LSP, promotores químicos específicos del hígado (LSP), el promotor de E2F, el promotor de telomerasa (hTERT); el potenciador de citomegalovirus/beta-actina de pollo/promotor de β -globina de conejo (promotor CAG; Niwa et al., Gene, 1991, 108(2):193-9) y el promotor del factor de elongación 1-alfa (EFL-alfa) (Kim et al., Gene, 1990, 91(2):217-23 y Guo et al., Gene Ther., 1996, 3(9):802-10). En algunas realizaciones, el promotor comprende un promotor de β -glucuronidasa humana o un potenciador de citomegalovirus enlazado a un promotor de β -actina de pollo (CBA). El promotor puede ser un promotor constitutivo, inducible o reprimible. En algunos casos, la divulgación proporciona un vector recombinante que comprende ácido nucleico que codifica un transgén heterólogo de la presente divulgación enlazado operativamente a un promotor de CBA. Se pueden encontrar promotores y descripciones ejemplares, *p. ej.*, en la Publicación PG de EE.UU. 20140335054.

Ejemplos de promotores constitutivos incluyen, sin limitación, el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) retroviral (opcionalmente con el potenciador del RSV), el promotor del citomegalovirus (CMV) (opcionalmente con el potenciador del CMV) [véase, p. ej., Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)], el promotor de SV40, el promotor dihidrofolato reductasa, el promotor 13-actina, el promotor fosfoglicerol quinasa (PGK) y el promotor EFla [Invitrogen].

5 Los promotores inducibles permiten la regulación de la expresión génica y pueden ser regulados por compuestos suministrados exógenamente, factores ambientales, tales como la temperatura, o la presencia de un estado fisiológico específico, p. ej., fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula o solo en células en replicación. Promotores inducibles y Sistemas inducibles están disponibles de una diversidad de fuentes comerciales, que incluyen, 10 sin limitación, Invitrogen, Clontech y Ariad. Se han descrito muchos otros sistemas y un experto en la técnica puede seleccionarlos fácilmente. Ejemplos de promotores inducibles regulados por promotores suministrados exógenamente incluyen el promotor de metalotionina de oveja (MT) inducible por zinc, el promotor del virus del tumor mamario de ratón inducible por dexametasona (Dex) (MMTV), el sistema promotor de la polimerasa T7 (documento WO 98/10088); el promotor de insectos ecdisona (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), el sistema reprimible 15 por tetraciclina (Gossen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)), el sistema inducible por tetraciclina (Gossen et al., Science, 268: 1766-1769 (1995), véase también Harvey et al., Curr. Opin. Chem. Biol., 2 : 512-518 (1998)), el sistema inducible por RU486 (Wang et al., Nat. Biotech., 15: 239-243 (1997) y Wang et al., Gene Ther., 4:432-441 (1997)) y el sistema inducible por rapamicina (Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)). Aún otros tipos de promotores inducibles que pueden ser útiles en este contexto son aquellos que están regulados por un 20 estado fisiológico específico, p. ej., temperatura, fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula, o solo en células replicantes.

En otra realización, se utilizará el promotor nativo, o un fragmento del mismo, para el transgén. El promotor nativo 25 puede utilizarse cuando se desee que la expresión del transgén imite la expresión nativa. El promotor nativo puede utilizarse cuando la expresión del transgén deba regularse temporalmente o en el desarrollo, o de una manera específica para el tejido, o en respuesta a estímulos transcripcionales específicos. En una realización adicional, también pueden utilizarse otros elementos de control de la expresión nativos, tales como elementos potenciadores, sitios de poliadenilación o secuencias consenso de Kozak para imitar la expresión nativa.

30 En algunas realizaciones, las secuencias reguladoras imparten capacidades de expresión génica específicas para el tejido. En algunos casos, las secuencias reguladoras específicas para el tejido se unen a factores de transcripción específicos para el tejido que inducen la transcripción de una manera específica para el tejido. Secuencias reguladoras específicas de tejido de este tipo (p. ej., promotores, potenciadores, etc.) son bien conocidas en la técnica. Secuencias reguladoras específicas para el tejido ejemplares incluyen, pero no se limitan a, los siguientes promotores específicos 35 para el tejido: promotor neuronal, tal como enolasa específica de neurona (NSE) (Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), el promotor del gen de la cadena ligera del neurofilamento (Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)) y el promotor del gen vgf específico de neurona (Piccioli et al., Neuron, 15:373 - 84 (1995)). En algunas realizaciones, el promotor específico para el tejido es un promotor de un gen seleccionado de: núcleos 40 neuronales (NeuN), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), poliposis coli adenomatosa (APC) y molécula adaptadora de unión a calcio ionizada 1 (Iba-1). Otros promotores específicos para el tejido apropiados resultarán evidentes para el experto en la materia. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de beta-actina de pollo.

En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo está bajo el control de una secuencia de promotor que se expresa en 45 una o más células del SNC. Se sabe en la técnica que muchas de las secuencias promotoras arriba enumeradas (p. ej., un promotor de CBA) se expresan en una o más células del SNC. En algunos casos, la secuencia de promotor puede expresarse de forma ubicua en un organismo y, por lo tanto, puede expresarse en una o más células del SNC en virtud de su suministro al SNC. En otros casos, puede utilizarse una secuencia de promotor que se expresa específicamente en el SNC, o un subconjunto de una o más células del SNC. En algunos casos, el ácido nucleico 50 heterólogo está enlazado operativamente a un promotor adecuado para la expresión del polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico en uno o más células del SNC. Como tal, en algunos casos, se puede utilizar un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico de la divulgación para tratar un trastorno del SNC.

En algunos casos, el promotor expresa el ácido nucleico heterólogo en una célula cerebral. Una célula cerebral puede referirse a cualquier célula cerebral conocida en la técnica, incluyendo sin limitación una neurona (tal como una 55 neurona sensorial, neurona motora, interneurona, neurona dopaminérgica, neurona espinosa media, neurona colinérgica, neurona GABAérgica, neurona piramidal, etc.), una célula glia (tal como microglia, macroglia, astrocitos, oligodendroctos, células ependimarias, glía radial, etc.), una célula del parénquima cerebral, una célula microglial, una célula ependemal y/o una célula de Purkinje. En algunos casos, el promotor expresa el ácido nucleico heterólogo en una neurona. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo se expresa exclusivamente en neuronas (p. ej., se 60 expresa en una neurona y no se expresa en otras células del SNC, tales como células gliales).

En algunos casos, la divulgación proporciona vectores rAAV para uso en métodos de prevenir o tratar uno o más defectos genéticos (p. ej., defectos genéticos hereditarios, alteraciones de genes somáticas y similares) en un mamífero, tal como, por ejemplo, un defecto genético que da como resultado una deficiencia de polipéptidos o un exceso de polipéptidos en un sujeto, o para tratar o reducir la gravedad o extensión de la deficiencia en un sujeto que manifiesta 65 un trastorno asociado al SNC vinculado a una deficiencia de dichos polipéptidos en células y tejidos. En algunos

casos, los métodos implican la administración de un vector rAAV que codifica uno o más péptidos terapéuticos, polipéptidos, ARNs funcionales, ácidos nucleicos inhibidores, ARNhC, microARN, nucleótidos antisentido, etc. en un soporte farmacéuticamente aceptable para el sujeto en una cantidad y durante un período de tiempo suficiente para tratar el trastorno asociado al SNC en el sujeto que tiene o se sospecha que tiene un trastorno de este tipo.

5 Un vector rAAV puede comprender, como un transgén, un ácido nucleico que codifica una proteína o ARN funcional que modula o trata un trastorno asociado al SNC. La siguiente es una lista no limitante de genes asociados con trastornos asociados al SNC: proteína inhibidora de la apoptosis neuronal (NAIP), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado de la glía (GDNF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), tirosina hidroxilasa (TM, GTP-ciclohidrolasa (GTPCH), aspartoacilasa (ASPA), superóxido dismutasa (SOD1), un antioxidante, un polipéptido antiangiogénico, un polipéptido antiinflamatorio y un aminoácido decorboxilasa (AADC). Por ejemplo, un transgén útil en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson codifica TH, que es una enzima limitante de la velocidad en la síntesis de dopamina. Un transgén que codifica GTPCII, que genera el cofactor TII tetrahidrobiopterina, también se puede utilizar en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Un transgén que codifica GDNF o BDNF, o AADC, que facilita la conversión de L-Dopa en DA, también se puede utilizar para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Para el tratamiento de ALS, un transgén útil puede codificar: GDNF, BDNF o CNTF. También para el tratamiento de ALS, un transgén útil puede codificar un ARN funcional, p. ej., ARNhC, miARN, que inhibe la expresión de SOD1. Para el tratamiento de la isquemia, un transgén útil puede codificar NAIP o NGF. Un transgén que codifica Beta-glucuronidasa (GUS) puede ser útil para el tratamiento de determinadas enfermedades de almacenamiento lisosómico (p. ej., mucopolisacaridosis tipo VII (MPS VII)). Un transgén que codifica un gen de activación de profármaco, p. ej., HSV-timidina quinasa que convierte ganciclovir en un nucleótido tóxico que interrumpe la síntesis de ADN y conduce a la muerte celular, puede ser útil para tratar determinados cánceres, p. ej., cuando se administra en combinación con el profármaco. Un transgén que codifica un opioide endógeno, tal como β-endorfina, puede ser útil para tratar el dolor. Ejemplos de antioxidantes incluyen, sin limitación, SOD1; SOD2; Catalasa; Sirtuins 1, 3, 4 o 5; NRF2; PGC1a; GCL (subunidad catalítica); GCL (subunidad modificadora); adiponectina; glutatión peroxidasa 1; y neuroglobina. Ejemplos de polipéptidos antiangiogénicos incluyen, sin limitación, angiostatina, endostatina, PEDF, un receptor de VEGF soluble y un receptor de PDGF soluble. Ejemplos de polipéptidos antiinflamatorios incluyen, sin limitación, IL-10, IL17R soluble, TNF-R soluble, TNF-R-Ig, un inhibidor de IL-1 y un inhibidor de IL18. Otros ejemplos de transgenes que pueden utilizarse en los vectores rAAV de la divulgación resultarán evidentes para el experto en la materia (véase, p. ej., Costantini L C, et al., Gene Therapy (2000) 7, 93-109).

30 Sin desear estar ligado a la teoría, se cree que un polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico puede utilizarse para reducir o eliminar la expresión y/o la actividad de un polipéptido, cuya ganancia de función se ha asociado con un trastorno, o para potenciar la expresión y/o actividad de un polipéptido para complementar una deficiencia que se ha asociado con un trastorno (p. ej., una mutación en un gen cuya expresión muestra una actividad similar o relacionada). Ejemplos no limitantes de trastornos de la divulgación que pueden tratarse con un polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico de la divulgación (genes ejemplares que pueden ser fijados como objetivo o suministrados se proporcionan entre paréntesis para cada uno de los trastornos) incluyen apoplejía (p. ej., caspasa-3, Beclin1, Ask1, PAR1, HIF1 α , PUMA, y/o cualquiera de los genes descritos en Fukuda, A.M. y Badaut, J. (2013) Genes (Basel) 4:435-456), enfermedad de Huntington (HTT) mutante), epilepsia (p. ej., SCN1A, NMDAR, ADK, y/o cualquiera de los genes descritos en Boison, D. (2010) Epilepsia 51:1659-1668), enfermedad de Parkinson (alfa-sinucleína), enfermedad de Lou Gehrig (también conocida como esclerosis lateral amiotrófica; SOD1), enfermedad de Alzheimer (tau, proteína precursora amiloide), degeneración corticobasal o CBD (tau), degeneración ganglionar corticogasal o CBGD (tau), demencia frontotemporal o FTD (tau), parálisis supranuclear progresiva o PSP (tau), atrofia del sistema múltiple o MSA (alfa-sinucleína), cáncer de cerebro (p. ej., un oncogén mutante o sobre-expresado implicado en el cáncer de cerebro) y enfermedades de almacenamiento lisosómico (LSD). Trastornos de la divulgación pueden incluir aquellos que implican grandes áreas de la corteza, p. ej., más de un área funcional de la corteza, más de un lóbulo de la corteza y/o toda la corteza. Otros ejemplos no limitantes de trastornos de la divulgación que pueden tratarse con un polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico de la divulgación incluyen lesión cerebral traumática, trastornos de disfunción enzimática, trastornos psiquiátricos (incluyendo el síndrome de estrés postraumático), enfermedades neurodegenerativas y trastornos cognitivos. trastornos (incluyendo demencias, autismo y depresión). Trastornos de disfunción enzimática incluyen, sin limitación, leucodistrofias (incluida la enfermedad de Canavan) y cualquiera de las enfermedades de almacenamiento lisosómico que se describen más adelante.

55 En algunos casos, el polipéptido terapéutico o el ácido nucleico terapéutico se utiliza para tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico. Como se conoce comúnmente en la técnica, las enfermedades de almacenamiento lisosómico son trastornos metabólicos hereditarios raros, caracterizados por defectos en la función lisosomal. Trastornos de este tipo son provocados a menudo por una deficiencia en una enzima requerida para el metabolismo adecuado de mucopolisacáridos, glicoproteínas y/o lípidos, lo que conduce a una acumulación patológica de materiales celulares almacenados lisosómicamente. Ejemplos no limitantes de enfermedades de almacenamiento lisosómico de la divulgación que pueden tratarse con un polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico de la divulgación (genes ejemplares que pueden ser fijados como objetivo o suministrados se proporcionan entre paréntesis para cada uno de los trastornos) incluyen la enfermedad de Gaucher tipo 2 o tipo 3 (beta-glucuronidasa ácida, GBA), gangliosidosis GM1 (beta-galactosidasa-1, GLB1), enfermedad de Hunter (iduronato 2-sulfatasa, IDS), enfermedad de Krabbe (galactosilceramidasa, GALC), una enfermedad de manosidosis (una manosidasa, tal como alfa-D-manosidasa, MAN2B1), enfermedad de β manosidosis (beta-manosidasa, MANBA), enfermedad de leucodistrofia

metacromática (pseudoarilsulfatasa A, ARSA), enfermedad de mucolipidosis II/III (N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa, *GNPTAB*), enfermedad de Niemann Pick A, (esfingomielinasa ácida, *ASM*), enfermedad de Niemann-Pick C (proteína de Niemann-Pick C, *NPC1*), enfermedad de Pompe (alfa-1,4-glucosidasa ácida, GAA), enfermedad de Sandhoff (subunidad beta de hexosaminidasa, *HEXB*), enfermedad de Sanfilippo A (N-sulfoglucosamina sulfohidrolasa, *MPS3A*), enfermedad de Sanfilippo B (N-alfa-acetilglucosaminidasa, *NAGLU*), enfermedad de Sanfilippo C (heparina acetil-CoA: alfa-glucosaminidasa N-acetiltransferasa, *MPS3C*), enfermedad de Sanfilippo D (N-acetilglucosamina-6-sulfatasa, *GNS*), enfermedad de Schindler (alfa-N-acetilgalactosaminidasa, *NAGA*), enfermedad de Sly (beta-glucuronidasa, *GUSB*), enfermedad de Tay-Sachs (subunidad alfa de hexosaminidasa, *HEXA*) y enfermedad de Wolman (lipasa ácida lisosomal, *LIPA*).

10

Enfermedades de almacenamiento lisosómico adicionales, así como la enzima defectuosa asociada con cada una de las enfermedades, se enumeran en la Tabla 1 que figura más adelante. En algunos casos, una enfermedad enumerada en la tabla siguiente se trata con un polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico de la divulgación que complementa o compensa de otro modo el defecto enzimático correspondiente.

Tabla 1 Trastornos del almacenamiento lisosómico y enzimas defectuosas asociadas.

Enfermedad por almacenamiento lisosómico	Enzima defectuosa
Aspartilglusoaminuria	Aspartilglucosaminidasa
Fabry	Alfa-galactosidasa A
Enfermedad de Batten Infantil (CNL1)	Palmitoil proteína tioesterasa
Enfermedad de Batten Infantil Tardía Clásica (CNL2)	Tripeptidil peptidasa.
Enfermedad de Batten Juvenil (CNL3), Batten, otras formas (CNL4-CNL8)	Proteína de transmembrana lisosomal productos génicos múltiples
Cistinosis,	Transportador de cisteína
Farber	Ceramidasa ácida
Fucosidosis,	alfa-L-fucosidasa ácida
Galactosidosialidosis	Proteína protectora/catepsina A
Gaucher tipos 1, 2 y 3	beta-glucosidasa ácida
Gangliosidosis GM1,	beta-galactosidasa ácida
Hunter	Iduronato-2-sulfatasa
Hurler-Scheie	alfa-L-iduronidasa
Krabbe	Galactocerebrosidasa
alfa-manosidosis	alfa-manosidasa ácida
beta-manosidosis	beta-manosidasa ácida
Maroteaux-Lamy	Arilsulfatasa B
Leucodistrofia metacromática,	Arilsulfatasa A
Morquio A	N-acetilgalactosamina-6-sulfato
Morquio B	beta-galactosidasa ácida
Mucolipidosis II/III,	N-acetilglucosamina-1-fosfotransferasa
Niemann-Pick A, B	Esfingomielinasa ácida
Niemann-Pick C	NPC-1
Pompe ácida	alfa-glucosidasa
Sandhoff	beta-hexosaminidasa B
Sanfillipo A	Heparán-N-sulfatasa
Sanfillipo B	alfa-N-acetilglucosaminidasa
Sanfillipo C	Acetil-CoA-alfa-glucosaminida N-acetiltransferasa
Sanfillipo D	N-acetilglucosamina-6-sulfato

Enfermedad por almacenamiento lisosómico	Enzima defectuosa
Enfermedad de Schindler	alfa-N-acetilgalactosaminidasa
Schindler-Kanzaki	alfa-N-acetilgalactosaminidasa
Sialidosis	alfa-neuramidasa
Sly	beta-glucuronidasa
Tay-Sachs	beta-hexosaminidasa A
Wolman	Lipasa ácida

Composiciones rAAV

En algunos casos, la divulgación proporciona composiciones que comprenden cualquiera de las partículas de rAAV descriptas en esta memoria. Generalmente, las composiciones para uso en los métodos y sistemas de la divulgación comprenden una cantidad eficaz de partículas de rAAV que comprenden vectores rAAV que codifican un polipéptido y/o ARN, opcionalmente en un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las partículas virales comprenden una cápside de AAV (p. ej., una cápside de AAV2 o AAVrh8R) en donde uno o más aminoácidos que interactúan con HSPG están sustituidos de manera que se reduce o elimina la unión de las partículas de rAAV a HSPG. Como es bien conocido en la técnica, los excipientes farmacéuticamente aceptables son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz y se pueden suministrar como soluciones o suspensiones líquidas, como emulsiones o como formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de su uso. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o puede actuar como un diluyente. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes encapsulantes, sustancias tamponantes del pH y tampones. Excipientes de este tipo incluyen cualquier agente farmacéutico adecuado para administración directa al ojo que pueda administrarse sin una toxicidad excesiva. Excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a sorbitol, cualquiera de los diversos compuestos Tween y líquidos, tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Pueden incluirse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como hidrocloruros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Una discusión detallada de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Generalmente, estas composiciones se formulan para su administración mediante inyección subretiniana. Por consiguiente, estas composiciones se pueden combinar con vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina, solución salina equilibrada de Ringer (pH 7,4) y similares. Aunque no es necesario, las composiciones se pueden suministrar opcionalmente en forma de dosificación unitaria adecuada para la administración de una cantidad precisa.

30 Métodos de suministro subretiniano de rAAV

Métodos de suministro subretiniano son conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase el documento WO 2009/105690. Brevemente, el método general para suministrar partículas de rAAV (p. ej., partículas de rAAV2, rAAVrh8R, etc.) a la subretina de la mácula y la fóvea puede ilustrarse mediante el siguiente breve esquema. Este ejemplo está destinado meramente a ilustrar determinadas características del método, y de ninguna manera pretende ser limitante.

Generalmente, el vector rAAV se puede suministrar en forma de una composición inyectada por vía intraocular (subretinal) bajo observación directa utilizando un microscopio quirúrgico. En algunas realizaciones, el vector se encapsula en una partícula de rAAV, en donde la partícula de rAAV comprende una cápside de rAAV que comprende proteínas de rAAV de la cápside que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúa con un proteoglicano de heparán sulfato (p. ej., Inhibe o elimina la unión a HSPG), y el vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV. Este proceso puede implicar una vitrectomía, seguida de la inyección de una suspensión de vector rAAV utilizando una cánula fina a través de una o más retinotomías pequeñas en el espacio subretiniano.

Brevemente, se puede suturar una cánula de infusión en su lugar para mantener un volumen normal del globo mediante infusión (de, p. ej., solución salina) durante toda la operación. Se realiza una vitrectomía utilizando una cánula de diámetro apropiado (por ejemplo, calibre 20 a 27), en donde el volumen de gel vítreo que se extrae se reemplaza por infusión de solución salina u otra solución isotónica de la cánula de infusión. La vitrectomía se realiza ventajosamente porque (1) la separación de su corteza (la membrana hialoidea posterior) facilita la penetración de la retina por la cánula; (2) su separación y reemplazo con fluido (p. ej., solución salina) crea espacio para alojar la inyección intraocular de vector, y (3) su separación controlada reduce la posibilidad de desgarros de la retina y desprendimiento de retina no planificado.

En algunos casos, la composición de rAAV se inyecta directamente en el espacio subretiniano fuera de la retina central, utilizando una cánula del tamaño de agujero apropiado (p. ej., calibre 27-45), creando, por lo tanto, una ampolla en el

espacio subretiniano. En otras realizaciones, la inyección subretiniana de la composición de rAAV está precedida por una inyección subretiniana de un pequeño volumen (*p. ej.*, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 ml) de un líquido apropiado (tal como solución salina o de Ringer) en el espacio subretiniano fuera de la retina central. Esta inyección inicial en el espacio subretiniano establece una ampolla de fluido inicial dentro del espacio subretiniano, provocando un desprendimiento de retina localizado en la ubicación de la ampolla inicial. Esta ampolla de fluido inicial puede facilitar el suministro fijado como objetivo de la composición de rAAV al espacio subretiniano (definiendo el plano de inyección antes del suministro de rAAV) y puede minimizar la posible administración de rAAV en la coroides y la posibilidad de inyección de rAAV o reflujo en la cavidad vítreo. En algunas realizaciones, esta ampolla de fluido inicial puede inyectarse adicionalmente con fluidos que comprenden una o más composiciones de rAAV y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales mediante la administración de estos fluidos directamente a la ampolla de fluido inicial con la misma o con cánulas de calibre fino adicionales.

La administración intraocular de las composiciones de rAAV y/o el pequeño volumen inicial de fluido se puede realizar utilizando una cánula de calibre fino (*p. ej.*, calibre 27-45) fijada a una jeringa. En algunas realizaciones, el émbolo de esta jeringa puede ser accionado por un dispositivo mecanizado, tal como presionando un pedal. La cánula de calibre fino se hace avanzar a través de la esclerotomía, a través de la cavidad vítreo y hacia la retina en un sitio predeterminado en cada sujeto de acuerdo con el área de la retina que se ha de apuntar (pero fuera de la retina central). Bajo visualización directa, la suspensión del vector se inyecta mecánicamente debajo de la retina neurosensorial, provocando un desprendimiento de retina localizado con una retinotomía autosellante no expansiva.

Como se señaló arriba, la composición de rAAV puede inyectarse directamente en el espacio subretiniano creando una ampolla fuera de la retina central o el vector puede inyectarse en una ampolla inicial fuera de la retina central, provocando que se expanda (y expandiendo el área de desprendimiento de la retina). En algunos casos, la inyección de la composición de rAAV va seguida de la inyección de otro fluido en la ampolla.

Sin desear estar ligado por la teoría, la velocidad y la ubicación de la o las inyecciones subretinianas pueden dar como resultado fuerzas de cizallamiento localizadas que pueden dañar la mácula, la fóvea y/o las células del RPE subyacentes. Las inyecciones subretinianas se pueden realizar a una velocidad que minimice o evite las fuerzas de cizallamiento. En algunos casos, la composición de rAAV se inyecta a lo largo de aproximadamente 15-17 minutos. En algunos casos, el vector se inyecta a lo largo de aproximadamente 17-20 minutos. En algunos casos, la composición de rAAV se inyecta a lo largo de aproximadamente 20-22 minutos. En algunos casos, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 35 a aproximadamente 65 $\mu\text{l}/\text{min}$. En algunos casos, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 40 $\mu\text{l}/\text{min}$. En algunos casos, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 45 $\mu\text{l}/\text{min}$. En algunos casos, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. En algunos casos, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 55 $\mu\text{l}/\text{min}$. En algunos casos, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 60 $\mu\text{l}/\text{min}$. En algunos casos, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 65 $\mu\text{l}/\text{min}$. Un experto en la técnica reconocería que la tasa y el tiempo de inyección de la ampolla pueden estar dirigidos, por ejemplo, por el volumen de la composición de rAAV o el tamaño de la ampolla necesario para crear suficiente desprendimiento de la retina para acceder a las células de la retina central, el tamaño de la cánula utilizada para suministrar la composición de rAAV y la capacidad de mantener de forma segura la posición de la cánula de la divulgación.

En algunos casos de la divulgación, el volumen de la composición inyectada en el espacio subretiniano de la retina es más de aproximadamente 1 μl , 2 μl , 3 μl , 4 μl , 5 μl , 6 μl , 7 μl , 8 μl , 9 μl , 10 μl , 15 μl , 20 μl , 25 μl , 50 μl , 75 μl , 100 μl , 200 μl , 300 μl , 400 μl , 500 μl , 600 μl , 700 μl , 800 μl , 900 μl o 1 mL, o cualquier cantidad entremedias.

En algunos casos, los métodos comprenden la administración al ojo (*p. ej.*, mediante administración subretiniana y/o intravítreo) de una cantidad eficaz de partículas virales recombinantes que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con el proteoglicano de heparán sulfato que comprende un vector, que codifica un ácido nucleico heterólogo. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es al menos aproximadamente cualquiera de 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 10×10^{12} , 11×10^{12} , 15×10^{12} , 20×10^{12} , 25×10^{12} , 30×10^{12} o 50×10^{12} copias de genoma/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es aproximadamente cualquiera de 5×10^{12} a 6×10^{12} , 6×10^{12} a 7×10^{12} , 7×10^{12} a 8×10^{12} , 8×10^{12} a 9×10^{12} , 9×10^{12} a 10×10^{12} , 10×10^{12} a 11×10^{12} , 11×10^{12} a 15×10^{12} , 15×10^{12} a 20×10^{12} , 20×10^{12} a 25×10^{12} , 25×10^{12} a 30×10^{12} , 30×10^{12} a 50×10^{12} o 50×10^{12} a 100×10^{12} copias de genoma/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es aproximadamente cualquiera de 5×10^{12} a 10×10^{12} , 10×10^{12} a 25×10^{12} o 25×10^{12} a 50×10^{12} copias de genoma/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es al menos aproximadamente cualquiera de 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 10×10^9 , 11×10^9 , 15×10^9 , 20×10^9 , 25×10^9 , 30×10^9 , 30×10^9 a 50×10^9 o 50×10^9 unidades de transducción/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es aproximadamente cualquiera de 5×10^9 a 6×10^9 , 6×10^9 a 7×10^9 , 7×10^9 a 8×10^9 , 8×10^9 a 9×10^9 , 9×10^9 a 10×10^9 , 10×10^9 a 11×10^9 , 11×10^9 a 15×10^9 , 15×10^9 a 20×10^9 , 20×10^9 a 25×10^9 , 25×10^9 a 30×10^9 , 30×10^9 a 50×10^9 o 50×10^9 a 100×10^9 unidades de transducción/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es aproximadamente cualquiera de 5×10^9 a 10×10^9 , 10×10^9 a 15×10^9 , 15×10^9 a 25×10^9 o 25×10^9 a 50×10^9 unidades de transducción/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es al menos aproximadamente cualquiera de aproximadamente 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 10×10^{10} , 11×10^{10} , 15×10^{10} , 20×10^{10} , 25×10^{10} , 30×10^{10} , 40×10^{10} o 50×10^{10} unidades infecciosas/mL. En algunas

realizaciones, el título viral de la composición es al menos cualquiera de aproximadamente 5×10^{10} a 6×10^{10} , 6×10^{10} a 7×10^{10} , 7×10^{10} a 8×10^{10} , 8×10^{10} a 9×10^{10} , 9×10^{10} a 10×10^{10} , 10×10^{10} a 11×10^{10} , 11×10^{10} a 15×10^{10} , 15×10^{10} a 20×10^{10} , 20×10^{10} a 25×10^{10} , 25×10^{10} a 30×10^{10} , 30×10^{10} a 40×10^{10} , 40×10^{10} a 50×10^{10} o 50×10^{10} a 100×10^{10} unidades infecciosas/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es al menos cualquiera de aproximadamente 5×10^{10} a 10×10^{10} , 10×10^{10} a 15×10^{10} , 15×10^{10} a 25×10^{10} o 25×10^{10} a 50×10^{10} unidades infecciosas/mL.

En algunos casos, los métodos comprenden la administración al ojo (*p. ej.*, mediante administración subretiniana y/o intravítreo) de un individuo (*p.ej.*, un ser humano) de una cantidad eficaz de partículas virales recombinantes que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con el proteoglicano de heparán sulfato. En algunas realizaciones, la dosis de partículas virales administrada al individuo es al menos aproximadamente cualquiera de 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{13} copias del genoma/kg de peso corporal. En algunas realizaciones, la dosis de partículas virales administrada al individuo es aproximadamente cualquiera de 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{13} copias del genoma/kg de peso corporal.

Se pueden crear una o varias (*p.ej.*, 2, 3 o más) ampollas. Generalmente, el volumen total de ampolla o ampollas creadas por los métodos y sistemas de la divulgación no puede exceder del volumen de fluido del ojo, por ejemplo, aproximadamente 4 ml en un sujeto humano típico. El volumen total de cada una de las ampollas individuales puede ser de al menos aproximadamente 0,3 ml, o al menos aproximadamente 0,5 ml con el fin de facilitar un desprendimiento de retina de tamaño suficiente para exponer los tipos de células de la retina central y crear una ampolla de dependencia suficiente para una manipulación óptima. Un experto en la técnica apreciará que al crear la ampolla de acuerdo con los métodos y sistemas de la divulgación, debe mantenerse la presión intraocular apropiada con el fin de evitar daños en las estructuras oculares. El tamaño de cada una de las ampollas individuales puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,2 ml, de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 ml, de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,2 ml, de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,0 ml, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 ml, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0 ml. Por tanto, en un ejemplo, para inyectar un total de 3 ml de suspensión de composición de rAAV, se pueden establecer 3 ampollas de aproximadamente 1 ml cada una. El volumen total de todas las ampollas en combinación puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 ml, aproximadamente 0,8 a aproximadamente 3,0 ml, aproximadamente 0,9 a aproximadamente 3,0 ml, aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0 ml, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 ml, aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,2 ml, aproximadamente 0,9 a aproximadamente 30 ml, aproximadamente 0,9 a aproximadamente 2,0 ml, aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,0 ml.

Con el fin de transducir de manera segura y eficiente áreas de la retina objetivo (*p. ej.*, la retina central) fuera del borde de la ubicación original de la ampolla, la ampolla puede manipularse para reposicionar la ampolla en el área diana para la transducción. La manipulación de la ampolla puede ocurrir por la dependencia de la ampolla que es creada por el volumen de la ampolla, el reposicionamiento del ojo que contiene la ampolla, el reposicionamiento de la cabeza del ser humano con un ojo u ojos que contienen una o más ampollas, y/o mediante intercambio fluido-aire. Esto es particularmente relevante para la retina central, ya que este área típicamente resiste el desprendimiento por inyección subretiniana. En algunas realizaciones se utiliza el intercambio de fluido-aire para reposicionar la ampolla; el líquido de la cánula de infusión se reemplaza temporalmente por aire, *p. ej.*, al soplar aire sobre la superficie de la retina. A medida que el volumen de aire desplaza el líquido de la cavidad vítreo de la superficie de la retina, el líquido de la cavidad vítreo puede fluir de una cánula. La ausencia temporal de presión del líquido de la cavidad vítreo hace que la ampolla se mueva y gravite hacia una parte dependiente del ojo. Colocando el globo ocular de manera apropiada, la ampolla de composición de rAAV subretiniana se manipula para implicar áreas adyacentes (*p. ej.*, la mácula y/o la fóvea). En algunos casos, la masa de la ampolla es suficiente para hacer que gravite, incluso sin el uso del intercambio fluido-aire. El movimiento de la ampolla a la ubicación deseada puede facilitarse, además, alterando la posición de la cabeza del sujeto, para permitir que la ampolla gravite hacia la ubicación deseada en el ojo. Una vez que se logra la configuración deseada de la ampolla, el líquido se devuelve a la cavidad vítreo. El líquido es un fluido apropiado, *p. ej.*, solución salina reciente. Generalmente, la composición de rAAV subretiniana puede dejarse *in situ* sin retinopexia a la retinotomía y sin taponamiento intraocular, y la retina se volverá a fijar espontáneamente en aproximadamente 48 horas.

Transduciendo de forma segura y eficaz células oculares (*p. ej.*, RPE y/o células fotorreceptoras de, *p. ej.*, la mácula y/o la fóvea) con un vector que comprende un polipéptido terapéutico o una secuencia de ARN, los métodos de la divulgación pueden utilizarse para tratar a un individuo; *p. ej.*, un ser humano que tiene un trastorno ocular, en donde las células transducidas producen el polipéptido terapéutico o la secuencia de ARN en una cantidad suficiente para tratar el trastorno ocular. En algunos casos, la transducción de las células oculares se mejora utilizando partículas de rAAV (*p. ej.*, partículas de rAAV2, rAAVrh8R, etc.) que comprende proteínas de la cápside de AAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos que interactúan con HSPG (*p. ej.*, inhibiendo o eliminando la unión a HSPG). En la invención, las partículas de rAAV demuestran una unión reducida a HSPG; *p. ej.*, reducido en más de aproximadamente 10%, 25%, 50%, 75%, 100% o cualquier número entremedias. En algunas realizaciones, la unión de rAAV a HSPG se reduce en aproximadamente un 5% a aproximadamente un 100%, en aproximadamente un 10% a aproximadamente un 50%, en aproximadamente un 10% a aproximadamente un 30%, en aproximadamente un 25% a aproximadamente un 75%, en aproximadamente un 25% a aproximadamente un 50%, o en aproximadamente un 30% y aproximadamente un 50%.

Se administra una cantidad eficaz de rAAV (en algunas realizaciones en forma de partículas), dependiendo de los objetivos del tratamiento. Por ejemplo, cuando un porcentaje bajo de transducción puede lograr el efecto terapéutico deseado, entonces el objetivo del tratamiento es generalmente alcanzar o superar este nivel de transducción. En algunos casos, este nivel de transducción se puede lograr mediante la transducción de solo aproximadamente 1 a 5% de las células diana, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 20% de las células del tipo de tejido deseado, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 50%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 80%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 95%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente 99% de las células del tipo de tejido deseado. Como se comentó anteriormente, la sustitución de uno o más aminoácidos de la cápside de rAAV que interactúan con HSPG mejora la transducción de rAAV. Como guía, el número de partículas administradas por inyección es generalmente entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{14} partículas, entre aproximadamente 1×10^7 y 1×10^{13} partículas, entre aproximadamente 1×10^9 y 1×10^{12} partículas o aproximadamente 1×10^{11} partículas. La composición de rAAV puede administrarse mediante una o más inyecciones subretinianas, ya sea durante el mismo proceso o espaciadas por días, semanas, meses o años. En algunas realizaciones, se pueden utilizar múltiples vectores para tratar al ser humano.

En algunos casos, la administración a la retina de una cantidad eficaz de partículas virales de rAAV que comprenden una cápside de rAAV con una o más sustituciones de aminoácidos que interactúan con HSPG transduce células fotorreceptoras en o cerca del sitio de administración. En algunas realizaciones, se transducen más de aproximadamente cualquiera de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% o 100% de las células fotorreceptoras. En algunas realizaciones, se transduce aproximadamente 5% a aproximadamente 100%, aproximadamente 10% a aproximadamente 50%, aproximadamente 10% a aproximadamente 30%, aproximadamente 25% a aproximadamente 75%, aproximadamente 25% a aproximadamente 50% o aproximadamente 30% a aproximadamente 50% de las células fotorreceptoras. Se conocen en la técnica métodos para identificar células fotorreceptoras transducidas por partículas virales de AAV que comprenden una cápside de rAAV con una o más sustituciones de aminoácidos que interactúan con HSPG; por ejemplo, puede utilizarse la inmunohistoquímica o el uso de un marcador tal como proteína fluorescente verde potenciada para detectar la transducción de partículas virales que comprenden una cápside de rAAV con una o más sustituciones de aminoácidos que interactúan con HSPG.

En algunos casos de la divulgación, los métodos comprenden la administración a la subretina (p. ej., el espacio subretiniano) de un mamífero una cantidad eficaz de partículas virales de AAV, partículas virales que comprenden una cápside de rAAV con una o más sustituciones de aminoácidos que interactúan con HSPG para tratar a un individuo con un trastorno ocular; p. ej., un ser humano con un trastorno ocular. En algunos casos, la composición se inyecta en uno o más lugares de la subretina para permitir la expresión de un ácido nucleico heterólogo en células fotorreceptoras. En algunos casos, la composición se inyecta en una cualquiera de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez localidades en la subretina.

En algunos casos, las partículas virales de rAAV que comprenden una cápside de rAAV con una o más sustituciones de aminoácidos que interactúan con HSPG se administran en más de una ubicación de forma simultánea o secuencial. En algunos casos, las inyecciones múltiples de partículas virales de rAAV no tienen más de una hora, dos horas, tres horas, cuatro horas, cinco horas, seis horas, nueve horas, doce horas o 24 horas de diferencia.

Métodos de inyección intravítreos

En la invención, la administración es a la sub-retina.

El método general para la inyección intravítreos puede ilustrarse mediante el siguiente breve esquema. Este ejemplo está destinado meramente a ilustrar determinadas características del método, y de ninguna manera pretende ser limitante. Procedimientos para la inyección intravítreos se conocen en la técnica (véase, p. ej., Peyman, G.A., et al. (2009) Retina 29(7):875-912 y Fagan, X.J. y Al-Qureshi, S. (2013) Clin. Experiment Ophthalmol. 41(5):500-7).

Brevemente, un sujeto para inyección intravítreos puede prepararse para el procedimiento mediante dilatación de la pupila, esterilización del ojo y administración de anestésico. Puede utilizarse cualquier agente midriático adecuado conocido en la técnica para la dilatación de la pupila. Se puede confirmar una dilatación de la pupila adecuada antes del tratamiento. La esterilización se puede lograr aplicando un tratamiento esterilizante del ojo, p. ej., una solución que contenga yoduro tal como povidona yodada (BETADINE®). También se puede utilizar una solución similar para limpiar el párpado, las pestañas y cualesquier otros tejidos cercanos (p. ej., piel). Puede utilizarse cualquier anestésico adecuado, tal como lidocaína o proparacaína, a cualquier concentración adecuada. El anestésico se puede administrar mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, gotas, geles o jaleas tópicos y aplicación subconjuntival del anestésico.

Antes de la inyección, se puede utilizar un espéculo de párpado esterilizado para despejar las pestañas de la zona. El lugar de la inyección se puede marcar con una jeringa. El lugar de la inyección se puede elegir en función del cristalino del paciente. Por ejemplo, el sitio de la inyección puede ser 3-3,5 mm del limbo en pacientes pseudofáquicos

o afáquicos, y 3,5-4 mm desde el limbo en pacientes fáquicos. El paciente puede mirar en dirección opuesta al lugar de la inyección.

- En algunos casos, los métodos comprenden la administración al ojo (*p. ej.*, mediante administración subretiniana y/o intravítreo) de una cantidad eficaz de partículas virales recombinantes que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con el proteoglicano de heparán sulfato que comprende un vector, que codifica un ácido nucleico heterólogo. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es al menos aproximadamente cualquiera de 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 10×10^{12} , 11×10^{12} , 15×10^{12} , 20×10^{12} , 25×10^{12} , 30×10^{12} o 50×10^{12} copias de genoma/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es aproximadamente cualquiera de 5×10^{12} a 6×10^{12} , 6×10^{12} a 7×10^{12} , 7×10^{12} a 8×10^{12} , 8×10^{12} a 9×10^{12} , 9×10^{12} a 10×10^{12} , 10×10^{12} a 11×10^{12} , 11×10^{12} a 15×10^{12} , 15×10^{12} a 20×10^{12} , 20×10^{12} a 25×10^{12} , 25×10^{12} a 30×10^{12} , 30×10^{12} a 50×10^{12} o 50×10^{12} a 100×10^{12} copias de genoma/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es aproximadamente cualquiera de 5×10^{12} a 10×10^{12} , 10×10^{12} a 25×10^{12} o 25×10^{12} a 50×10^{12} copias de genoma/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es al menos aproximadamente cualquiera de 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 10×10^9 , 11×10^9 , 15×10^9 , 20×10^9 , 25×10^9 , 30×10^9 o 50×10^9 unidades de transducción/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es aproximadamente cualquiera de 5×10^9 a 6×10^9 , 6×10^9 a 7×10^9 , 7×10^9 a 8×10^9 , 8×10^9 a 9×10^9 , 9×10^9 a 10×10^9 , 10×10^9 a 11×10^9 , 11×10^9 a 15×10^9 , 15×10^9 a 20×10^9 , 20×10^9 a 25×10^9 , 25×10^9 a 30×10^9 , 30×10^9 a 50×10^9 o 50×10^9 a 100×10^9 unidades de transducción/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es aproximadamente cualquiera de 5×10^9 a 10×10^9 , 10×10^9 a 15×10^9 , 15×10^9 a 25×10^9 o 25×10^9 a 50×10^9 unidades de transducción/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es al menos aproximadamente cualquiera de aproximadamente 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 10×10^{10} , 11×10^{10} , 15×10^{10} , 20×10^{10} , 25×10^{10} , 30×10^{10} , 40×10^{10} o 50×10^{10} unidades infecciosas/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es al menos cualquiera de aproximadamente 5×10^{10} a 6×10^{10} , 6×10^{10} a 7×10^{10} , 7×10^{10} a 8×10^{10} , 8×10^{10} a 9×10^{10} , 9×10^{10} a 10×10^{10} , 10×10^{10} a 11×10^{10} , 11×10^{10} a 15×10^{10} , 15×10^{10} a 20×10^{10} , 20×10^{10} a 25×10^{10} , 25×10^{10} a 30×10^{10} , 30×10^{10} a 40×10^{10} , 40×10^{10} a 50×10^{10} o 50×10^{10} a 100×10^{10} unidades infecciosas/mL. En algunas realizaciones, el título viral de la composición es al menos cualquiera de aproximadamente 5×10^{10} a 10×10^{10} , 10×10^{10} a 15×10^{10} , 15×10^{10} a 25×10^{10} o 25×10^{10} a 50×10^{10} unidades infecciosas/mL.
- En algunos casos, los métodos comprenden la administración al ojo (*p. ej.*, mediante administración subretiniana y/o intravítreo) de un individuo (*p.ej.*, un ser humano) de una cantidad eficaz de partículas virales recombinantes que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con el proteoglicano de heparán sulfato. En algunos casos, la dosis de partículas virales administrada al individuo es al menos aproximadamente cualquiera de 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{13} copias del genoma/kg de peso corporal. En algunos casos, la dosis de partículas virales administrada al individuo es aproximadamente cualquiera de 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{13} copias del genoma/kg de peso corporal.

Durante la inyección, la aguja puede insertarse perpendicularmente a la esclerótica y apuntarse al centro del ojo. La aguja puede insertarse de manera que la punta termine en el vítreo, en lugar de en el espacio subretiniano. Puede utilizarse cualquier volumen adecuado conocido en la técnica para inyección. Despues de la inyección, el ojo puede tratarse con un agente esterilizante tal como un antibiótico. También se puede enjuagar el ojo para eliminar el exceso de agente esterilizante.

45 **Estructura de la retina y medios para determinar la eficacia del suministro de rAAV**

Se sabe que la retina contiene múltiples capas. Capas de células en la retina pueden incluir la membrana limitante interna, fibra nerviosa, células ganglionares, plexiforme interno, nuclear interno, plexiforme externo, nuclear externo, membrana limitante externa, fotorreceptor y capas de epitelio pigmentario retiniano. La capa más próxima al vítreo es la membrana limitante interna. Esta capa puede contener células de Müller, una clase de glía. La capa de fibras nerviosas puede contener axones de células ganglionares que forman el nervio óptico. La capa de células ganglionares puede incluir células ganglionares y células amacrinas. La capa plexiforme interna puede contener sinapsis entre las dendritas del ganglio y las células amacrinas y axones de las células bipolares. La capa nuclear interna puede contener núcleos celulares de células amacrinas, bipolares y horizontales. La capa plexiforme externa puede contener sinapsis entre las dendritas de las células horizontales y las proyecciones de las células fotorreceptoras. La capa nuclear exterior puede contener cuerpos de células fotorreceptoras. La membrana limitante externa o exterior puede incluir conexiones celulares, tales como uniones adherentes y desmosomas, entre los procesos apicales de las células de Müller y entre estos procesos y los segmentos internos de las células fotorreceptoras. La capa de fotorreceptores, también conocida como la capa de bastones y conos y la membrana de Jacob, puede contener células fotorreceptoras que incluyen bastones y conos. La capa retiniana más distal al vítreo es el epitelio pigmentario de la retina (RPE), que puede incluir una capa de células epiteliales hexagonales que contienen gránulos de pigmento.

También se sabe que la retina contiene muchos tipos de células diferentes. Las neuronas de la retina pueden incluir células fotorreceptoras, células bipolares, células ganglionares, células amacrinas y células horizontales. Las células fotorreceptoras son sensibles a la luz. Pueden sentir la luz y responder transmitiendo señales al nervio óptico a través

- de las células bipolares y las células ganglionares. Las células fotorreceptoras pueden incluir células de bastón, que generalmente detectan la luz en condiciones de poca luz, y células de cono, que generalmente detectan el color y la percepción de luz más brillante. Las células bipolares pueden recibir información de las células fotorreceptoras y hacer sinapsis con células amacrinas o ganglionares. Las células ganglionares pueden recibir información de células amacrinas o células horizontales, y sus axones forman el nervio óptico. Las células horizontales pueden integrar entradas de múltiples fotorreceptores y ayudar en el ajuste a los niveles de luz. Las células amacrinas son interneuronas que ayudan a regular las células bipolares y proporcionan entradas a las células ganglionares. Las células gliales de la retina pueden incluir células de Müller, astroglia y microglia.
- 5 La eficacia de la administración de rAAV mediante inyección subretiniana o intravítreo puede controlarse mediante varios criterios como se describe en esta memoria. Por ejemplo, después del tratamiento en un sujeto utilizando métodos de la presente divulgación, el sujeto puede ser evaluado para, *p. ej.*, una mejora y/o estabilización y/o retraso en la progresión de uno o más signos o síntomas del estado patológico por uno o más más parámetros clínicos, incluyendo los descritos en esta memoria. Ejemplos de ensayos de este tipo se conocen en la técnica e incluyen medidas objetivas así como subjetivas (*p. ej.*, informadas por el sujeto). Por ejemplo, para medir la efectividad de un tratamiento en la función visual de un sujeto, se pueden evaluar uno o más de los siguientes: la calidad subjetiva de la visión del sujeto o la función mejorada de la visión central (*p. ej.*, una mejora en la capacidad del sujeto de leer con fluidez y reconocer caras), la movilidad visual del sujeto (*p. ej.*, una disminución en el tiempo necesario para navegar por un laberinto), la agudeza visual (*p. ej.*, una mejora en la puntuación LogMAR del sujeto), la microperimetria (*p. ej.*, una mejora en la puntuación de dB del sujeto), perimetria adaptada a la oscuridad (*p. ej.*, una mejora en la puntuación de dB del sujeto), el mapeo de matriz fina (*p. ej.*, una mejora en la puntuación de dB del sujeto), perimetria de Goldmann (*p. ej.*, un tamaño reducido del área de escotoma(*es decir*, áreas de ceguera) y mejora de la capacidad para resolver objetivos más pequeños), sensibilidades al parpadeo (*p. ej.*, una mejora en Hertz), autofluorescencia y mediciones de electrofisiología (*p. ej.*, mejora en el ERG). En algunas realizaciones, la función visual se mide por la movilidad visual del sujeto. En algunas realizaciones, la función visual se mide por la agudeza visual del sujeto. En algunas realizaciones, la función visual se mide por microperimetria. En algunas realizaciones, la función visual se mide mediante una perimetria adaptada a la oscuridad. En algunas realizaciones, la función visual se mide mediante ERG. En algunas realizaciones, la función visual se mide por la calidad de visión subjetiva del sujeto.
- 10 En el caso de enfermedades que dan como resultado una función visual degenerativa progresiva, el tratamiento del sujeto en una edad temprana puede no solo dar como resultado una ralentización o detención de la progresión de la enfermedad, sino que también puede mejorar o prevenir la pérdida de la función visual debido a la ambliopía adquirida. La ambliopía puede ser de dos tipos. En estudios en primates no humanos y gatitos que se mantienen en total oscuridad desde el nacimiento hasta incluso unos pocos meses de edad, los animales, incluso cuando se exponen posteriormente a la luz, son funcionalmente irreversiblemente ciegos, a pesar de tener señales funcionales enviadas por la retina. Esta ceguera se produce porque las conexiones neuronales y la "educación" de la corteza se detienen desde el nacimiento debido a la detención del estímulo. Se desconoce si esta función podría restaurarse alguna vez. En el caso de las enfermedades de la degeneración de la retina, la circuitería de la corteza visual normal se "aprendió" inicialmente o fueron apropiados para el desarrollo hasta el punto en el que la degeneración creó una disfunción significativa. La pérdida de estímulo visual en términos de señalización en el ojo disfuncional crea una disfunción "adquirida" o "aprendida" ("ambliopía adquirida"), lo que resulta en la incapacidad del cerebro para interpretar señales o "utilizar" ese ojo. Se desconoce en estos casos de "ambliopía adquirida" si la mejora de la señalización de la retina como resultado de la terapia génica del ojo ambliópico podría alguna vez resultar en una ganancia de función más normal además de una desaceleración de la progresión o una estabilización del estado de la enfermedad. En algunas realizaciones, el ser humano tratado tiene menos de 30 años de edad. En algunas realizaciones, el ser humano tratado tiene menos de 20 años de edad. En algunas realizaciones, el ser humano tratado tiene menos de 18 años de edad. En algunas realizaciones, el ser humano tratado tiene menos de 15 años de edad. En algunas realizaciones, el ser humano tratado tiene menos de 14 años de edad. En algunas realizaciones, el ser humano tratado tiene menos de 13 años de edad. En algunas realizaciones, el ser humano tratado tiene menos de 12 años de edad. En algunas realizaciones, el ser humano tratado tiene menos de 10 años de edad. En algunas realizaciones, el ser humano tratado tiene menos de 8 años de edad. En algunas realizaciones, el ser humano tratado tiene menos de 6 años de edad.
- 15 En algunos trastornos oculares, existe un fenómeno de "célula enfermera", en el que la mejora de la función de un tipo de célula mejora la función de otro. Por ejemplo, la transducción del RPE de la retina central por un rAAV de la divulgación puede entonces mejorar la función de los bastones y, a su vez, la función mejorada de los bastones da como resultado una función del cono mejorada. Por consiguiente, el tratamiento de un tipo de célula puede dar como resultado una función mejorada en otro.
- 20 La selección de un vector rAAV particular y de la composición depende de un cierto número de factores diferentes, que incluyen, pero no se limitan a, el historial médico del ser humano individual y las características de la afección y el individuo que está siendo tratado. La evaluación de características de este tipo y el diseño de un régimen terapéutico apropiado es, en última instancia, responsabilidad del médico que prescribe.
- 25 En algunas realizaciones, el ser humano que se ha de tratar tiene un trastorno ocular genético, pero aún no ha manifestado signos o síntomas clínicos. En algunas realizaciones, el ser humano a tratar tiene un trastorno ocular. En algunas realizaciones, el ser humano a tratar ha manifestado uno o más signos o síntomas de un trastorno ocular.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55

Ejemplos no limitantes de trastornos oculares que pueden ser tratados por los sistemas y métodos de la divulgación incluyen: degeneración retiniana autosómica recesiva severa de inicio temprano (amaurosis congénita de Leber), acromatopsia congénita, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Best, enfermedad de Doyne, distrofia de conos, 5 retinitis pigmentosa, retinosquisis ligada al cromosoma X, síndrome de Usher, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular atrófica relacionada con la edad, AMD neovascular, maculopatía diabética, retinopatía diabética proliferativa (PDR), edema macular cistoide, retinopatía serosa central, desprendimiento de retina, inflamación intraocular, glaucoma, uveítis posterior, coroideremia y neuropatía óptica hereditaria de Leber.

- 10 Composiciones de la divulgación (*p. ej.*, partículas virales de AAV para suministro subretiniano o intravítreo que comprenden una cápside de AAV con una o más sustituciones de aminoácidos que interactúan con HSPG o en una o más posiciones correspondientes a los aminoácidos 484, 487, 532, 585 o 588) puede utilizarse solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar trastornos oculares. El intervalo entre la administración secuencial puede ser en términos de al menos (o, alternativamente, menos de) minutos, horas o días.
- 15 En algunas realizaciones, se pueden administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales a la subretina o al vítreo (*p. ej.*, mediante administración intravítreo). Ejemplos no limitantes del agente terapéutico adicional incluyen factores neurotróficos polipeptídicos (*p. ej.*, GDNF, CNTF, BDNF, FGF2, PEDF, EPO), factores anti-angiogénicos polipeptídicos (*p. ej.*, sFlt, angiostatina, endostatina), ácidos nucleicos anti-angiogénicos (*p. ej.*, ARNip, miARN, ribozima), por ejemplo ácidos nucleicos anti-angiogénicos contra VEGF, morfolinos anti-angiogénicos, por ejemplo morfolinos anti-angiogénicos contra VEGF, anticuerpos anti-angiogénicos y/o fragmentos de anticuerpos (*p. ej.*, fragmentos Fab), por ejemplo, anticuerpos anti-angiogénicos y/o fragmentos de anticuerpos contra VEGF.

V. Construcciones de Expresión

- 25 En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de suministro de ácido nucleico heterólogo al ojo mediante el suministro subretiniano de un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y en donde el vector rAAV está encapsulado en una cápside de rAAV (*p. ej.*, una cápside de rAAV2, una cápside de rAAVrh8R, etc) que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que interactúan con HSPG. En algunos casos, la divulgación proporciona 30 métodos para tratar un trastorno del SNC en un individuo, que comprenden el suministro de una composición que comprende partículas de rAAV al SNC del individuo, en donde las partículas de rAAV comprenden (a) una cápside de rAAV que comprende una proteína de la cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato, y (b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV. En algunas realizaciones, el ácido nucleico 35 heterólogo (*p. ej.*, un transgén) está enlazado operativamente a un promotor. Promotores ejemplares incluyen, pero no se limitan a, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), el RSV LTR, el MoMLV LTR, el promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un promotor del virus simio 40 (SV40) y un promotor de CK6, un promotor de transtiretina (TTR), un promotor de TK, un promotor de respuesta a tetraciclina (TRE), un promotor de VHB, un promotor de hAAT, un promotor de LSP, promotores químéricos específicos del hígado (LSP), el promotor de E2F, el 40 promotor de telomerasa (hTERT); el potenciador de citomegalovirus/beta-actina de pollo/promotor de β-globina de conejo (promotor CAG; Niwa et al., Gene, 1991, 108(2):193-9) y el promotor del factor de elongación 1-alfa (EFL-alfa) (Kim et al., Gene, 1990, 91(2):217-23 y Guo et al., Gene Ther., 1996, 3(9):802-10). En algunas realizaciones, el promotor comprende un promotor de β-glucuronidasa humana o un potenciador de citomegalovirus enlazado a un 45 promotor de β-actina de pollo (CBA). El promotor puede ser un promotor constitutivo, inducible o reprimible. En algunas realizaciones, el promotor es capaz de expresar el ácido nucleico heterólogo en una célula del ojo. En algunas realizaciones, el promotor es capaz de expresar el ácido nucleico heterólogo en células fotorreceptoras o el RPE. En realizaciones, el promotor es un promotor de rodopsina quinasa (RK); *p. ej.*, un promotor RK humano. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de opsina; *p. ej.*, un promotor de opsina humana o un promotor de opsina de ratón.

- 50 La presente divulgación contempla el uso de un genoma viral recombinante para la introducción de una o más secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido terapéutico y/o ácido nucleico para empaquetamiento en una partícula viral de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que interactúan con HSPG. El genoma viral recombinante puede incluir cualquier elemento para establecer la expresión del polipéptido y/o ácido 55 nucleico terapéutico, por ejemplo, un promotor, un ITR, un elemento de unión a ribosoma, terminador, potenciador, marcador de selección, intrón, señal poliA y/u origen de la replicación.

- En algunas realizaciones, el vector rAAV es un vector rAAV auto-complementario, *p. ej.*, uno que comprende un genoma auto-complementario recombinante (el término "auto-complementario" puede utilizarse de forma indistinta en esta memoria). Partículas virales de AAV con genomas y métodos de auto-complementación del uso de genomas de AAV auto-complementados se describen en las Patentes de EE.UU. N°s 6.596.535; 7.125.717; 7.465.583; 7.785.888; 7.790.154; 7.846.729; 8.093.054; y 8.361.457; y Wang Z., et al., (2003) Gene Ther 10:2105- 2111.

- 65 Un rAAV que comprende un genoma auto-complementario formará rápidamente una molécula de ADN de doble cadena en virtud de sus secuencias parcialmente complementarias (*p. ej.*, cadenas complementarias codificantes y no codificantes de un transgén). En algunas realizaciones, el vector comprende una primera secuencia de ácido

nucleico que codifica el ácido nucleico heterólogo y una segunda secuencia de ácido nucleico que codifica un complemento del ácido nucleico, en que la primera secuencia de ácido nucleico puede formar pares de bases intracadena con la segunda secuencia de ácido nucleico a lo largo de la mayoría o toda su longitud.

- 5 En algunas realizaciones, la primera secuencia de ácido nucleico heterólogo y una segunda secuencia de ácido nucleico heterólogo están enlazadas por una ITR mutada (*p. ej.*, la ITR derecha). En algunas realizaciones, la ITR comprende la secuencia polinucleotídica 5'-
 CACTCCCTCTCTCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGGTCGCC
 10 CACGCCCCGGCTTGCCCGGG - 3' (SEQ ID NO:8). La ITR mutada comprende una delección de la región D que comprende la secuencia de resolución terminal. Como resultado, al replicar un genoma viral de AAV, las proteínas rep no escindirán el genoma viral en la ITR mutada y, como tal, un genoma viral recombinante que comprende lo siguiente en orden 5' a 3' se empaquetará en una cápside viral: una ITR de AAV, la primera secuencia polinucleotídica heteróloga que incluye secuencias reguladoras, la ITR de AAV mutada, el segundo polinucleótido heterólogo en orientación inversa al primer polinucleótido heterólogo y una tercera ITR de AAV.
 15

VI. Partículas virales y métodos de producir partículas virales

Partículas virales rAAV

- 20 En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de suministro de ácido nucleico heterólogo al ojo mediante el suministro subretiniano de un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y en donde el vector rAAV está encapsulado en una cápside de rAAV (*p. ej.*, una cápside de rAAV2, de rAAVrh8R, etc) que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que interactúan con HSPG. En algunos casos, la divulgación proporciona métodos y kits relacionados con el suministro de partículas de rAAV al SNC de un individuo.
 25

- En algunos casos, la partícula de rAAV comprende un vector rAAV. En algunas realizaciones, la partícula viral es una partícula de AAV recombinante que comprende un ácido nucleico que comprende un transgén heterólogo flanqueado por una o dos repeticiones terminales invertidas (ITRs) de AAV. El ácido nucleico está encapsulado en la partícula de AAV. La partícula AAV también comprende proteínas de la cápside. En algunas realizaciones, el ácido nucleico comprende la secuencia o las secuencias codificantes de interés (*p. ej.*, un transgén heterólogo) componentes enlazados operativamente en la dirección de la transcripción, secuencias de control que incluyen secuencias de inicio y terminación de la transcripción, formando con ello un casete de expresión.
 30

- 35 El casete de expresión está flanqueado en el extremo 5 'y 3' por al menos una secuencia de ITR de AAV funcional. Por "secuencias de ITR de AAV funcionales" se entiende que las secuencias de ITR funcionan según lo previsto para el rescate, la replicación y el empaquetamiento del virión de AAV. Véase, Davidson et al., PNAS, 2000, 97(7):3428-32; Passini et al., J. Virol., 2003, 77(12):7034-40; y Pechan et al., Gene Ther., 2009, 16:10-16.

- 40 Para poner en práctica algunos aspectos de la invención, los vectores recombinantes comprenden al menos todas las secuencias de AAV esenciales para la encapsidación y las estructuras físicas para la infección por el rAAV. Las ITRs de AAV para uso en los vectores de la divulgación no necesitan tener una secuencia de nucleótidos de tipo salvaje (*p. ej.*, tal como se describe en Kotin, Hum. Gene Ther., 1994, 5:793-801) y pueden alterarse mediante la inserción, la delección o sustitución de nucleótidos o las ITRs de AAV pueden derivarse de cualquiera de varios serotipos de AAV. Actualmente se conocen más de 40 serotipos de AAV y se siguen identificando nuevos serotipos y variantes de los serotipos existentes. Véase, Gao et al., PNAS, 2002, 99(18): 11854-6; Gao et al., PNAS, 2003, 100(10):6081-6; y Bossis et al., J. Virol., 2003, 77(12):6799-810.
 45

- 50 En algunas realizaciones, un vector rAAV es un vector derivado de un serotipo de AAV, incluyendo, sin limitación, las ITRs de AAV son AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino o ITR de AAV de ratón o similares. En algunas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende una ITR de AAV. ITRs de AAV son AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón o similar. En determinadas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende un ITR de AAV2. Como se describió *supra*, las partículas de rAAV 55 comprenden una cápside de rAAV2 que comprende proteínas de la cápside de rAAV2 que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interaccionan con un proteoglicano de heparán sulfato..

- 60 En algunas realizaciones, un vector puede incluir un ácido nucleico de relleno. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno puede codificar una proteína verde fluorescente. En algunas realizaciones, el ácido nucleico de relleno puede estar ubicado entre el promotor y el ácido nucleico que codifica el ARNi.

- 65 Se utilizan diferentes serotipos de AAV para optimizar la transducción de células diana particulares o para fijar como objetivo tipos de células específicos dentro de un tejido diana particular (*p. ej.*, un tejido del SNC). Una partícula de rAAV puede comprender proteínas virales y ácidos nucleicos virales del mismo serotipo o un serotipo mixto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una partícula de rAAV puede comprender proteínas de la cápside de AAV2 de la divulgación y al menos una ITR de AAV2 o puede comprender proteínas de la cápside de AAV2 y al menos una ITR

de AAV1. En la invención, la partícula de rAAV comprende una cápside de rAAV2 que comprende proteínas de la cápside de rAAV2.

Producción de partículas de AAV

5 Se conocen numerosos métodos en la técnica para la producción de vectores rAAV, incluyendo transfección, producción de líneas celulares estables y sistemas de producción de virus híbridos infecciosos que incluyen híbridos de adenovirus-AAV, híbridos de herpesvirus-AAV (Conway, JE et al., (1997) J Virology 71(11): 8780-8789) e híbridos de baculovirus-AAV. Todos los cultivos de producción de rAAV para la producción de partículas de virus de rAAV
10 requieren; 1) células huésped adecuadas, incluyendo, por ejemplo, líneas celulares derivadas de seres humanos tales como células HeLa, A549 o 293, o líneas celulares derivadas de insectos tales como SF-9, en el caso de sistemas de producción de baculovirus; 2) función de virus auxiliar adecuada, proporcionada por adenovirus de tipo salvaje o mutante (tal como adenovirus sensible a la temperatura), virus herpes, baculovirus o una construcción de plásmido que proporciona funciones auxiliares; 3) genes y productos génicos rep y cap de AAV; 4) un transgén (tal como un
15 transgén terapéutico) flanqueado por al menos una secuencia ITR de AAV; y 5) medios y componentes de medios adecuados para respaldar la producción de rAAV. Se pueden utilizar medios adecuados conocidos en la técnica para la producción de vectores rAAV. Estos medios incluyen, sin limitación, medios producidos por Hyclone Laboratories y JRH, incluyendo el medio de Eagle modificado (MEM), el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), formulaciones personalizadas, tales como las descritas en la Patente de EE.UU. Nº 6.566.118 y medios SFM Sf-900
20 II, tal como se describe en la Patente de EE.UU. Nº 6.723.551, particularmente con respecto a formulaciones de medios personalizados para uso en la producción de vectores AAV recombinantes.

25 Las partículas de rAAV se pueden producir utilizando métodos conocidos en la técnica. Véase, *p. ej.*, la Pat. de EE.UU. Nºs 6.566.118; 6,989,264; y 6,995,006. En la práctica de la divulgación, las células huésped para producir partículas de rAAV incluyen células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, microorganismos y levaduras. Células huésped también pueden ser células de empaquetamiento en las que los genes rep y cap de AAV se mantienen de forma estable en la célula huésped o células productoras en las que el genoma del vector AAV se mantiene de forma estable. Células de empaquetamiento y productoras ejemplares se derivan de células 293, A549 o HeLa. Vectores AAV se purifican y formulan utilizando técnicas estándares conocidas en la técnica.

30 30 En algunas realizaciones, las partículas de rAAV pueden producirse mediante un método de triple transfección, tal como el método de triple transfección ejemplar proporcionado *infra*. Brevemente, un plásmido que contiene un gen rep y un gen de la cápside, junto con un plásmido adenoviral auxiliar, se puede transfectar (*p. ej.*, utilizando el método del fosfato de calcio) en una línea celular (*p. ej.*, células HEK-293), y el virus se puede recolectar y opcionalmente purificar.

40 35 En algunas realizaciones, partículas de rAAV se pueden producir por un método de la línea celular productora, tal como el método productor de la línea celular ejemplar proporcionada *infra* (véase también (referenciado en Martin et al, (2013) Human Gene Therapy Methods 24:253-269). Brevemente, una línea celular (*p. ej.*, una línea celular HeLa)
45 puede transfectarse de manera estable con un plásmido que contiene un gen rep, un gen de la cápside y una secuencia promotora-transgénica. Las líneas celulares pueden rastrearse para seleccionar un clon conductor para la producción de rAAV, que luego puede expandirse a un biorreactor de producción e infectarse con un adenovirus (*p. ej.*, un adenovirus de tipo salvaje) como auxiliar para iniciar la producción de rAAV. Posteriormente, el virus puede recolectarse, el adenovirus puede inactivarse (*p. ej.*, por calor) y/o eliminarse, y las partículas de rAAV pueden purificarse.

50 50 En algunos casos, se proporciona un método para producir cualquier partícula de rAAV como se describe en esta memoria que comprende (a) cultivar una célula huésped bajo una condición de que se produzcan partículas de rAAV, en donde la célula huésped comprende (i) uno o más genes del paquete de AAV, en donde cada uno de dichos genes de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación y/o encapsidación de AAV; (ii) un pro-vector de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido terapéutico y/o ácido nucleico tal como se describe en esta memoria flanqueado por al menos una ITR de AAV, y (iii) una función auxiliar de AAV; y (b) recuperar las partículas de rAAV producidas por la célula huésped. En algunos casos, dicha al menos un ITR de AAV se selecciona del grupo que consta de ITRs de AAV son AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9,
55 AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón o similares. En algunos casos, dicha proteína de encapsidación comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato. En algunos casos, la proteína de encapsidación es una proteína de encapsidación de AAV2. En algunos casos, la proteína de encapsidación es una proteína de encapsidación de AAVrh8R.

60 60 Medios de cultivo de producción de rAAV adecuados de la presente divulgación pueden complementarse con suero o proteínas recombinantes derivadas de suero a un nivel de 0,5% -20% (v/v o p/v). Alternativamente, como se conoce en la técnica, los vectores rAAV pueden producirse en condiciones libres de suero, a los que también se alude como medios sin productos derivados de animales. Un experto ordinario en la técnica puede apreciar que medios comerciales o personalizados diseñados para apoyar la producción de vectores rAAV también pueden complementarse con uno o más componentes de cultivo celular conocidos en la técnica, que incluyen, sin limitación,

glucosa, vitaminas, aminoácidos y/o factores de crecimiento., con el fin de aumentar el título de rAAV en cultivos de producción.

5 Los cultivos de producción de rAAV pueden cultivarse bajo una diversidad de condiciones (a lo largo de un amplio intervalo de temperaturas, durante períodos de tiempo variables y similares), adecuadas para la célula huésped particular que se esté utilizando. Como se conoce en la técnica, los cultivos de producción de rAAV incluyen cultivos dependientes de la unión que pueden cultivarse en recipientes dependientes de la fijación adecuados, tales como, por ejemplo, frascos roll on, filtros de fibra hueca, microsoportes y biorreactores de lecho empaquetado o de lecho fluidizado. Los cultivos de producción del vector rAAV también pueden incluir células huésped adaptadas a la suspensión, tales como células HeLa, 293 y SF-9, que pueden cultivarse de diversas formas, incluyendo, por ejemplo, matraces giratorios, biorreactores de tanque agitado y sistemas desechables, tales como el sistema de bolsas Wave.

10 Partículas del vector rAAV de la divulgación se pueden recolectar de cultivos de producción de rAAV por lisis de las células huésped del cultivo de producción o por recolección del medio gastado del cultivo de producción, siempre que las células se cultiven en condiciones conocidas en la técnica que provocan la liberación de partículas de rAAV en el medio desde células intactas, tal como se describe con más detalle en la Patente de EE.UU. N° 6.566.118). También se conocen en la técnica métodos adecuados para lisar células e incluyen, por ejemplo, múltiples ciclos de congelación/descongelación, tratamiento con ultrasonidos, microfluidización y tratamiento con productos químicos, tales como detergentes y/o proteasas.

15 20 En una realización adicional, las partículas de rAAV se purifican. El término «purificado», tal como se utiliza en esta memoria, incluye una preparación de partículas de rAAV desprovistas de al menos algunos de los otros componentes que también pueden estar presentes, en donde las partículas de rAAV se producen de forma natural o se preparan inicialmente. Así, por ejemplo, se pueden preparar partículas de rAAV aisladas utilizando una técnica de purificación para enriquecerlas a partir de una mezcla fuente, tal como un lisado de cultivo o un sobrenadante de cultivo de producción. El enriquecimiento se puede medir de diversas formas, tales como, por ejemplo, mediante la proporción de partículas resistentes a la DNasa (DRPs) o copias del genoma (gc) presentes en una solución, o mediante la infectividad, o se puede medir con relación a una segunda sustancia potencialmente interferente presente en la mezcla fuente, tal como contaminantes, incluyendo los contaminantes del cultivo de producción o los contaminantes en proceso, incluyendo el virus auxiliar, componentes de los medios y similares.

25 30 35 En algunos casos, la recolección del cultivo de producción de rAAV se aclara para eliminar restos de la célula huésped. En algunos casos, la recolección del cultivo de producción se clarifica mediante filtración a través de una serie de filtros de profundidad que incluyen, por ejemplo, un filtro de cápsula de calidad DOHC Millipore Millistak + HC, un filtro de cápsula de grado A1HC Millipore Millistak + HC y un filtro de 0,2 µm Opticap XL1O de membrana hidrofílica Millipore Express SHC. La clarificación también se puede lograr mediante una diversidad de otras técnicas estándares conocidas en la técnica, tales como centrifugación o filtración a través de cualquier filtro de acetato de celulosa de 0,2 µm o mayor tamaño de poro conocido en la técnica.

40 45 50 En algunos casos, la recolección del cultivo de producción de rAAV se trata adicionalmente con Benzonase® para digerir cualquier ADN de alto peso molecular presente en el cultivo de producción. En algunos casos, la digestión con Benzonase® se realiza bajo condiciones estándares conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, una concentración final de 1-2,5 unidades/ml de Benzonase® a una temperatura que varía desde el ambiente hasta 37°C durante un período de 30 minutos a varias horas.

55 Partículas de rAAV pueden aislarse o purificarse utilizando una o más de las siguientes etapas de purificación: centrifugación en equilibrio; filtración de intercambio aniónico de flujo continuo; filtración de flujo tangencial (TFF) para concentrar las partículas de rAAV; captura de rAAV por cromatografía de apatita; inactivación por calor del virus auxiliar; captura de rAAV por cromatografía de interacción hidrofóbica; intercambio de tampón mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC); nanofiltración; y captura de rAAV mediante cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de afinidad. Estas etapas pueden utilizarse solas, en diversas combinaciones o en diferentes órdenes. En algunos casos, el método comprende todas las etapas en el orden que se describe más adelante. Métodos para purificar partículas de rAAV se encuentran, por ejemplo, en Xiao et al., (1998) Journal of Virology 72:2224-2232; Patentes de EE.UU. Números 6,989,264 y 8,137,948; y documento WO 2010/148143.

60 65 También se proporcionan en esta memoria composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula de rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido terapéutico y/o ácido nucleico terapéutico, en donde la partícula de rAAV comprende una cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones o aminoácidos que interactúan con HSPG, y un soporte farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para cualquier modo de administración descrito en esta memoria; por ejemplo, por administración subretiniana.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden un rAAV descrito en esta memoria y un soporte farmacéuticamente aceptable son adecuadas para la administración a seres humanos. Soportes de este tipo son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a edición, págs. 1035-1038

y 1570-1580). En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden un rAAV descrito en esta memoria y un soporte farmacéuticamente aceptable son adecuadas para la inyección ocular. Soportes farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceite, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y similares.

5 También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa, polietilenglicol (PEG) y glicerol como soportes líquidos, particularmente para soluciones inyectables. La composición farmacéutica puede comprender, además, ingredientes adicionales, por ejemplo conservantes, tampones, agentes de tonicidad, antioxidantes y estabilizadores, agentes humectantes o clarificantes no iónicos, agentes que aumentan la viscosidad y similares. Las 10 composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria pueden envasarse en dosis unitarias únicas o en formas de múltiples dosis. Las composiciones se formulan generalmente como solución estéril y sustancialmente isotónica.

VII. Sistemas y Kits

15 Las composiciones de rAAV como se describen en esta memoria pueden estar contenidas dentro de un sistema diseñado para su uso en uno de los métodos de la divulgación como se describe en esta memoria.

Suministro Subretiniano

20 En algunos casos, la divulgación proporciona un sistema para el suministro subretiniano de un vector a un ojo de un individuo, que comprende a) una composición que comprende una cantidad eficaz de partículas de rAAV, en donde i) una proteína de la cápside de las partículas de rAAV comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de heparán sulfato, y ii) el vector comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido terapéutico o ARN terapéutico y al menos una repetición AAV terminal; y b) un dispositivo para el suministro retiniano del rAAV

25 Generalmente, el sistema comprende una cánula de calibre fino, en donde la cánula es de calibre 27 a 45, una o más jeringas (*p. ej.*, 1, 2, 3, 4 o más) y uno o más fluidos (*p. ej.*, 1, 2, 3, 4 o más) adecuados para su uso en los métodos de la divulgación.

30 La cánula de calibre fino es adecuada para la inyección subretiniana de la suspensión de vector y/u otros fluidos a inyectar en el espacio subretiniano. En algunos casos, la cánula tiene un calibre de 27 a 45. En algunos casos, la cánula de calibre fino es de calibre 35-41. En algunos casos, la cánula de calibre fino es de calibre 40 o 41. En algunos casos, la cánula de calibre fino es de calibre 41. La cánula puede ser cualquier tipo de cánula adecuado, por ejemplo, una cánula de-Juan® o una cánula Eagle®.

35 La jeringa puede ser cualquier jeringa adecuada, con la condición de que pueda conectarse a la cánula para el suministro de un fluido. En algunos casos, la jeringa es una jeringa del sistema Accurus®. En algunos casos, el sistema tiene una jeringa. En algunos casos, el sistema tiene dos jeringas. En algunos casos, el sistema tiene tres jeringas. En algunos casos, el sistema tiene cuatro o más jeringas.

40 El sistema puede comprender, además, una bomba de inyección automatizada, que puede activarse, *p. ej.*, mediante un pedal.

45 Los fluidos adecuados para uso en los métodos de la divulgación incluyen los descritos en esta memoria, por ejemplo, uno o más fluidos que comprenden cada uno una cantidad eficaz de uno o más vectores tal como se describe en esta memoria, uno o más fluidos para crear una ampolla inicial (*p. ej.*, solución salina u otro fluido apropiado) y uno o más fluidos que comprenden uno o más agentes terapéuticos.

50 Los fluidos adecuados para uso en los métodos de la divulgación incluyen los descritos en esta memoria, por ejemplo, uno o más fluidos que comprenden cada uno una cantidad eficaz de uno o más vectores tal como se describe en esta memoria, uno o más fluidos para crear una ampolla inicial (*p. ej.*, solución salina u otro fluido apropiado) y uno o más fluidos que comprenden uno o más agentes terapéuticos.

55 En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es mayor que aproximadamente 0,8 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es al menos aproximadamente 0,9 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es al menos aproximadamente 1,0 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es al menos aproximadamente 1,5 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es al menos aproximadamente 2,0 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es mayor que aproximadamente 0,8 a aproximadamente 3,0 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es mayor que aproximadamente 0,8 a aproximadamente 2,5 ml. En algunas realiaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es mayor que aproximadamente 0,8 a aproximadamente 2,0 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es mayor que aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,5 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es mayor que aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,0 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es

aproximadamente 0,9 a aproximadamente 3,0 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es aproximadamente 0,9 a aproximadamente 2,5 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es aproximadamente 0,9 a aproximadamente 2,0 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,5 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,0 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0 ml. En algunos casos, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 ml.

10 El fluido para crear la ampolla inicial puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 ml. En algunos casos, el volumen total de todos los fluidos del sistema es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 ml.

15 En algunos casos, el sistema comprende un solo fluido (*p. ej.*, un fluido que comprende una cantidad eficaz del vector). En algunos casos, el sistema comprende 2 fluidos. En algunos casos, el sistema comprende 3 fluidos. En algunos casos, el sistema tiene 4 o más fluidos.

Excipientes

20 Como es bien conocido en la técnica, los excipientes farmacéuticamente aceptables son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz y se pueden suministrar como soluciones o suspensiones líquidas, como emulsiones o como formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de su uso. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o puede actuar como un diluyente. Excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para variar la osmolaridad, agentes encapsulantes, sustancias tamponantes del pH y tampones. Excipientes de este tipo incluyen cualquier agente farmacéutico adecuado para administración directa al ojo que pueda administrarse sin una toxicidad excesiva. Excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a sorbitol, cualquiera de los diversos compuestos TWEEN y líquidos, tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Pueden incluirse sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales, tales como hidrocloruros, hidrobromuros, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Una discusión detallada de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

35 En algunas realizaciones relacionadas con el suministro subretiniano y/o al SNC, excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir soportes farmacéuticamente aceptables. Soportes farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceite, incluyendo los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y similares. También se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa, polietilenglicol (PEG) y glicerol como soportes líquidos, particularmente para soluciones inyectables. También se pueden utilizar ingredientes adicionales, por ejemplo conservantes, tampones, 40 agentes de tonicidad, antioxidantes y estabilizadores, agentes humectantes o clarificantes no iónicos, agentes que aumentan la viscosidad y similares. Los kits descritos en esta memoria pueden envasarse en dosis unitarias únicas o en formas de múltiples dosis. Los contenidos de los kits se formulan generalmente como solución estéril y sustancialmente isotónica.

EJEMPLOS

50 La invención se entenderá más completamente con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención. Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritas en esta memoria tienen únicamente fines ilustrativos y que se sugerirán a los expertos en la técnica diversas modificaciones o cambios a la vista de los mismos.

Ejemplo 1: Mutaciones en los residuos de arginina requeridos para la unión a HSPG disminuyen la transducción mediada por AAV2 en líneas celulares cultivadas

55 Vectores de terapia génica AAV2 se están utilizando actualmente en ensayos clínicos para indicaciones oculares. Estos vectores se pueden suministrar mediante una vía de administración intravítreo, que en ratones y primates no humanos da como resultado la transducción de células ganglionares de la retina y células de Müller, o mediante una vía de administración subretiniana, que fija como objetivo las células epiteliales pigmentadas de la retina y células fotorreceptoras. Diferentes serotipos de AAV utilizan diferentes receptores y correceptores de la superficie celular para la infección. Se sabe que el receptor de superficie celular primario para AAV2 es proteoglicano de heparán sulfato (HSPG) (Summerford, C. y Samulski, R.J. (1998) J. Virol. 72(2):1438-45). Comprender el mecanismo por el cual AAV2 transduce la retina es importante para un desarrollo adicional de los vectores de terapia génica AAV.

65 Para investigar el papel de la unión a HSPG en la transducción de AAV2 de la retina, se generaron vectores de AAV2 con proteínas de la cápside que portan mutaciones en residuos de arginina que se sabe que son necesarios para la unión a HSPG (AAV2 HBKO). Estos vectores dieron como resultado una transducción significativamente reducida de

células 293 y HeLa en cultivo, en comparación con el AAV2 de tipo salvaje. Sorprendentemente, el vector AAV2HBKO suministrado de modo subretiniano al ojo del ratón dio como resultado un aumento de 2 log en la transducción en comparación con el AAV2 de tipo salvaje. Sin embargo, cuando el vector AAV2HBKO se suministró por vía intravítreo, no fue evidente transducción alguna. Estos resultados indican que las mutaciones en los aminoácidos requeridas para la unión a HSPG tienen efectos opuestos sobre la eficacia de la transducción después de la inyección subretiniana frente a la intravítreo de partículas de AAV2.

Métodos

10 **Construcción del Plásmido Mutante de Arginina AAV2**

El plásmido rep/cap de AAV2, pIM45BD, se mutó utilizando el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios Quikchange Lightning (Agilent Technologies). Se diseñó un cebador de mutagénesis por PCR para introducir cambios de argininas 585 y 588 en alaninas. Los mutantes positivos se confirmaron mediante secuenciación.

15 **Generación de Vectores rAAV**

Se produjeron vectores AAV recombinantes que expresaban proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) o híbrido de receptor de VEGF soluble (sFLT02) mediante transfección triple de células 293 utilizando el plásmido pIM45BD o pIM45BDR585A/R588A rep/cap y pAdHelper. Los transgenes estaban bajo el control de los promotores de la β-actina de pollo (CBA) o de la rodopsina quinasa humana (RK).

Ensayos de Transducción *in vitro*

25 Células 293 o HeLa se sembraron en placas de 24 pocillos ($1 - 2 \times 10^5$ células por pocillo). 24 horas después de la siembra, las células fueron infectadas con 1×10^3 vg/célula (+) Ad5ts149. La eficiencia de transducción se midió 48 horas después de la infección por fluorescencia EGFP o por ELISA para cuantificar sFLT02 en el medio (ELISA VEGF R1 soluble humano de R&D Systems).

30 **Animales**

Se adquirieron ratones C57BL/6 adultos obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) y se mantuvieron en el vivero de Genzyme. Los animales tuvieron acceso libre a alimentos y agua durante el tiempo del estudio. Todos los procesos se realizaron bajo un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales.

35 **Inyección intravítreo**

40 El letargo se indujo y se mantuvo utilizando isoflurano al 3,5% portado en 800 mL/minuto de oxígeno suministrado al animal a través de un cono nasal. Se inyectó un microlitro de artículo de ensayo en el humor vítreo utilizando una jeringa Hamilton equipada con una aguja biselada de calibre 33 (Hamilton Co., Reno, NV). La aguja se dirigió a través de la esclerótica aproximadamente 2 mm por debajo del limbo y se hizo avanzar con cuidado hacia la cámara vítreo para evitar el contacto con el cristalino. El artículo de ensayo se suministró a lo largo de un período de 1-2 segundos. Despues de la inyección, la aguja se mantuvo en su posición durante aproximadamente cinco segundos antes de retirarla. Se dejó que el animal se recuperara de la anestesia antes de regresar a su jaula.

45 **Inyección Subretiniana**

50 Se indujo midriasis y cicloplejía con una aplicación tópica de Tropicamida (Alcon, Fort Worth, TX). El letargo se indujo y se mantuvo utilizando isoflurano al 3,5% portado en 800 mL/minuto de oxígeno suministrado al animal a través de un cono nasal. El ojo se inmovilizó con unas pinzas de punta anular (World Precision Instruments, Sarasota, FL) y se colocó una incisión piloto aproximadamente 2 mm por debajo del limbo en la esclerótica utilizando una aguja de calibre 30. Se dirigió una aguja de punta roma de calibre 33 a través de la incisión y se hizo avanzar posteriormente hasta que la punta penetró en la retina neurosensorial posterior. Se administró un microlitro de artículo de ensayo a lo largo de un segundo. La aguja se mantuvo en su posición durante aproximadamente cinco segundos antes de retirarla. Se dejó que el animal se recuperara de la anestesia antes de regresar a su jaula.

Histología por EGFP

55 La señal de EGFP sin procesar se observó utilizando un microscopio de epifluorescencia en ojos fijados con formalina procesados para la inclusión en parafina.

Resultados

60 Como se muestra en la FIG. 1, se ha demostrado que cinco residuos de la cápside son críticos para la unión de AAV2 a HSPG. Se construyó un mutante de AAV2 con dos sustituciones de aminoácidos en estos residuos: R585A y R588A

(la numeración se basa en la secuencia de aminoácidos de VP1). Este mutante, al que se alude como HBKO, se testó en cuanto a su capacidad de transducir células en cultivo.

Las líneas celulares humanas se hicieron crecer en cultivo y se transdijeron con partículas de AAV2 de tipo salvaje o mutantes HBKO. Para medir la eficacia de la transducción, los genomas virales de ambos tipos de partículas de AAV2 se modificaron para incluir transgenes utilizando el promotor de CBA ubicuo para impulsar la expresión de Flt soluble (receptor 1 de VEGF humano). 48 horas después de la transducción, se midió la eficiencia de la transducción utilizando un inmunoensayo basado en ELISA para cuantificar la cantidad de Flt producida. La FIG. 2 demuestra que el mutante HBKO mostró una capacidad muy reducida de transducir células 293 humanas en cultivo. Utilizando número de partículas iguales de AAV2 y células 293, el mutante HBKO mostró una reducción del 99,6% en la eficiencia de transducción en comparación con el tipo salvaje

Para medir este efecto en múltiples líneas celulares humanas, se transdijeron células 293 y Hela como se describió arriba. Para estos ensayos, los vectores se modificaron para expresar EGFP, en lugar de Flt, del promotor de CBA. La FIG. 3 muestra que el AAV2 de tipo salvaje fue capaz de transducir ambas líneas celulares, según se midió por fluorescencia de EGFP. En contraste, el mutante HBKO tuvo una disminución drástica en la transducción de ambas líneas celulares. Estos resultados confirman que el mutante HBKO tiene una capacidad drásticamente reducida para transducir líneas celulares de cáncer de cuello uterino y riñón embrionario humano en cultivo.

20 Ejemplo 2: Mutaciones en los residuos de arginina requeridos para la unión a HSPG tienen efectos opuestos sobre la transducción mediada por AAV2 después de la inyección intravítrea frente a la subretiniana.

Se ensayó en el ratón la capacidad de las partículas de AAV2 mutantes de HBKO de transducir las células oculares tras la inyección intravítrea y subretiniana. Las FIGS. 4A y 4B comparan la eficiencia de transducción de partículas de tipo salvaje y HBKO AAV2 tras la inyección intravítrea o subretiniana. Para estos experimentos, la eficacia de la transducción se ensayó midiendo la expresión de Flt soluble (sFLT) tras la transducción con partículas de AAV2 que portan un transgén que usa el promotor de CBA ubicuo para impulsar la expresión de Flt. Utilizando inyección intravítrea, el mutante HBKO mostró una capacidad muy reducida de transducir células (FIG. 4A).

30 Sorprendentemente, el mutante HBKO mostró una transducción potenciada después de la inyección subretiniana (FIG. 4B). Este aumento se observó consistentemente cuando la cantidad de genomas del vector AAV2 inyectados se varió 10 veces (10^8 y 10^9 vg, como se marca). Estos resultados contrastan con los observados en líneas celulares cultivadas y tras la inyección intravítrea. Estos datos apuntan a la importancia de la capacidad de unión de HSPG en la mediación de la transducción de diferentes tipos de células oculares y capas retinianas mediante diferentes tipos de inyecciones intraoculares.

35 Para visualizar la transducción de células retinianas, se utilizaron partículas de AAV2 de tipo salvaje o mutantes HBKO que portan un transgén que expresaba EGFP del promotor ubicuo de CBA. Como se muestra en la FIG. 5, las partículas de AAV2 de tipo salvaje pudieron transducir la retina después de la inyección intravítrea, como lo demuestra la fluorescencia de GFP. Sin embargo, las partículas de AAV2 mutantes HBKO no mostraron fluorescencia de GFP detectable tras la inyección intravítrea. Estos resultados están de acuerdo con los presentados en la FIG. 4A.

40 La FIG. 6 cuantificó la eficiencia de transducción de partículas de AAV2 de tipo salvaje (AAV2 CBA) y mutante HBKO (AAV2 CBA HBKO) tras la inyección subretiniana. Para medir la transducción, ambas partículas de AAV2 tenían genomas de vector que incluían un transgén que expresaba Flt utilizando el promotor ubicuo de CBA. Se utilizaron dos cantidades de genomas de vector para las inyecciones, como se indica en la FIG. 6. Estos resultados confirman la observación mostrada en la FIG. 4B y demuestran el sorprendente hallazgo de que residuos mutantes requeridos para la unión a HSPG aumentan la capacidad de AAV2 de transducir células después de la inyección subretiniana.

45 50 Para visualizar la transducción, se utilizaron partículas de AAV2 de tipo salvaje o mutantes HBKO que portan un transgén que expresaba EGFP del promotor ubicuo de CBA. Como se muestra en la FIG. 7, la fluorescencia de GFP en la retina aumenta tras la transducción con partículas de AAV2 mutantes HBKO, en comparación con las de tipo salvaje.

55 Debido a que se sabe que la inyección subretiniana fija como objetivo capas celulares con células fotorreceptoras, se estudió la capacidad de las partículas de AAV2 mutantes HBKO de transducir fotorreceptores. En el ojo, se sabe que el promotor de la rodopsina quinasa (RK) impulsa la expresión específicamente en las células fotorreceptoras, tales como las células conos y bastones (Khani, S.C., et al. (2007) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 48(9):3954-61). Por lo tanto, se generaron partículas de AAV2 de tipo salvaje y mutantes HBKO con genomas de vector que portaban un transgén utilizando el promotor de RK para impulsar la expresión de Flt. Como se muestra en la FIG. 8, partículas de AAV2 mutantes HBKO mostraron una transducción potenciada de células fotorreceptoras después de la inyección subretiniana, en comparación con las de tipo salvaje. Esta observación se observó consistentemente después de la inyección con 10 veces cantidades diferentes de los genomas vectoriales (10^8 y 10^9 vg como se marca). Estos resultados demuestran el sorprendente resultado de que la mutación de los residuos requeridos para la unión de HSPG mejora la capacidad de las partículas de AAV2 de transducir las células fotorreceptoras de la retina después

de la inyección subretiniana. La mutación de estos residuos representa una forma potencial de potenciar la transducción de células fotorreceptoras para la terapia génica mediada por AAV2.

AAV es un virus de ADN de cadena sencilla sin envoltura que es un miembro de la familia de los parvovirus. Los diferentes serotipos de AAV, incluyendo AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, etc demuestran diferentes perfiles de distribución tisular. Los diversos tropismos tisulares de estas cápsides de AAV han permitido que los vectores basados en AAV se utilicen para aplicaciones de transferencia génica generalizadas tanto *in vitro* como *in vivo* para hígado, músculo esquelético, cerebro, retina, corazón y médula espinal (Wu, Z., et al., (2006) Molecular Therapy, 14: 316-327). La fijación de un virus a una célula huésped requiere interacciones específicas de la cápside del virus con moléculas receptoras celulares. Se ha demostrado previamente que la cápside de AAV2 utiliza proteoglicano de heparán sulfato (HSPG), integrina V 5 y receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos humanos como receptores primarios y secundarios para mediar en la entrada celular de vectores de terapia génica basados en AAV2 (Summerford, C. y R.J. Samulski (1998) J. Virology, 72: 1438-1445; Summerford, C. et al., (1999) Nat. Medicine, 5: 78-82; Qing, K., et al., (1999) Nat. Medicine, 5: 71-77). El análisis mutacional de las proteínas de la cápside de AAV2 ha demostrado que un grupo de aminoácidos de carácter básico, a saber, argininas R484, R487, R585, R588 y lisina K532, contribuyen en la unión a heparán y la transducción *in vitro* de células y la transducción hepática *in vivo* de vectores AAV2. Las mutaciones en estos residuos de aminoácidos condujeron a una gran disminución de la transducción hepática de vectores basados en AAV2 por la vía de administración intravenosa y una transferencia incrementada de genes del músculo cardíaco y esquelético (Kern, A. et al., (2003) J. Virology, 77: 11072-11081; Muller, O.J. et al., (2006) Cardiovascular Research, 70: 70-78).

Se investigó el papel de estos aminoácidos de carácter básico en la transducción de vectores AAV2 en la retina tanto por vía intravítreo como por vía subretiniana de administración del vector. La mutación de R585 y R588 eliminó significativamente la transducción *in vitro* de células HEK293 y células Hela (**FIGS. 2 y 3**). Dalkara D et al., ((2009) Molecular Therapy, 17: 2096-2102) sugieren que los vectores AAV2 suministrados por vía intravítreo no logran penetrar en la retina externa debido a que se unen a los proteoglicanos de heparán sulfato que abundan en la membrana limitante interna de la retina. Como se muestra en los presentes ejemplos, tras el suministro intravítreo, los vectores mutados R585/R588 son menos capaces de transducción de la retina interna en comparación con los vectores AAV2 de tipo salvaje (**FIGS. 4A y 5**), lo que sugiere que la unión a HSPG es importante para la transducción intravítreo. de la retina. El suministro subretiniano de vectores basados en AAV2 conduce a una transducción predominantemente de epitelio pigmentado retiniano (RPE) y a una cierta transducción de células fotorreceptoras. Sorprendentemente, se encontró que los vectores mutados R585/588 transducen la retina externa al menos 10 veces mejor que los vectores AAV2 de tipo salvaje (**FIGS. 4B, 6, y 7**). Utilizando el promotor de rodopsina quinasa (RK) específico para el fotorreceptor, la expresión del transgén en los fotorreceptores aumenta significativamente con el vector mutante AAV2 R585/R588 (**FIG. 8**). Estos vectores basados en mutaciones en los residuos de aminoácidos de carácter básico en la cápside de AAV2 serán muy beneficiosos para la transducción de la retina externa, especialmente las células fotorreceptoras para el tratamiento de una diversidad de trastornos de la retina.

Ejemplo 3 de Referencia: Expresión Generalizada de GFP después del Suministro Intraestriatal del Vector AAV2HBKO

A través de mutaciones dirigidas al sitio introducidas en la cápside de AAV2, se generó un vector mutante AAV2 HBKO que es incapaz de unirse a la heparina. El perfil de transducción de este vector HBKO se evaluó tanto en ratones de tipo salvaje como en un modelo de ratón HD (YAC128) utilizando inyecciones intraestriatales únicas.

Métodos

Construcción del Plásmido Mutante de Arginina AAV2

El plásmido rep/cap de AAV2, pIM45BD, se mutó utilizando el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios Quikchange Lightning (Agilent Technologies). Se diseñó un cebador de mutagénesis por PCR para introducir cambios de arginina en alanina en residuos 585 y 588. Los mutantes positivos se confirmaron mediante secuenciación.

Producción de Vectores AAV

Vectores AAV recombinantes se produjeron por triple transfección (utilizando fosfato cálcico) de células 293 de carcinoma de riñón embrionario humano (HEK-293) como se describió previamente (Xiao et al. (1998) J. Virol. 72:2224-2232). Brevemente, se utilizó un plásmido que contenía el gen rep del serotipo 2 y un gen de la cápside del serotipo 1 o 2 junto con un plásmido adenoviral auxiliar (Stratagene, Palo Alto, CA). Los transgenes estaban bajo el control del promotor de beta-actina de pollo (CBA). El virus se recogió 72 horas después de la transfección y se purificó en columna como se describió previamente (Xiao et al. (1998) J. Virol. 72:2224-2232).

Animales

Todos los procesos se realizaron utilizando un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Uso y Cuidado Animal de Genzyme, una Compañía Sanofi (Departamento de Salud y Servicios Humanos, Publicación NIH 86-23). Los

ratones utilizados incluyeron ratones YAC128 (un cromosoma artificial de levadura que alberga el transgén *HTT* mutante humano de longitud completa con 128 repeticiones CAG sobre un fondo FVB/NJ puro) y ratones de camada FVB/NJ de tipo salvaje (Slow et al. (2003) Hum. Mol. Genet. 12:1555-1567; Van Raamsdonk et al. (2005) Hum. Mol. Genet. 14:3823-3835). Tanto los ratones YAC128 como los compañeros de camada FVB/NJ se obtuvieron de una colonia de Genzyme alojada en Charles River Laboratories. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz / oscuridad de 12 h con comida y agua disponibles *ad libitum*. Todos los ensayos de comportamiento se realizaron durante el ciclo de luz de los animales (entre las 8 am y las 4 pm). Los valores N para todos los experimentos se muestran en las Tablas 2 y 3 que figuran a continuación.

10 **Tabla 2** Ratones de tipo salvaje tratados con partículas de AAV que expresan GFP (Experimento 1).

Tratamiento	valor n (ratones WT)	Dosis (DRPs)
AAV2HBKO-CBA-GFP	6	6x10 ⁹
AAV2-CBA-GFP	6	6x10 ⁹

15 **Tabla 3** Ratones YAC128 tratados con partículas de AAV que expresan miARN de Htt y GFP (Experimento 2).

Tratamiento	valor n (ratones YAC128)	Dosis (DRPs)
AAV2HBKO-CBA-miARN-Htt-GFP	8	6x10 ⁹
AAV 1-CBA-miARN-Htt-GFP	8	1,5x10 ¹⁰
No tratados	8	N/D

Procesos Quirúrgicos

20 Los animales se anestesiaron con isofluorano al 3% y se colocaron en un marco estereotáxico. Las inyecciones intracraneales se realizaron tal como se describió previamente (Stanek et al. (2014) Hum. Gene Ther. 25:461-474). Brevemente, se inyectaron 3 µl de los vectores virales recombinantes en el cuerpo estriado (AP, +0,50; ML, ± 2,00; DV, -2,5 de bregma y dura; barra de incisivos, 0,0) utilizando una jeringa Hamilton de 10 µl a un caudal de 0,5 µl/min. La aguja se dejó en su lugar durante 1 min después de completar la infusión. Una hora antes de la cirugía y durante 24 h después de la cirugía, se administró a los ratones ketoprofeno (5 mg/kg) por vía subcutánea para la analgesia.

25 Perfusión de los animales y recogida de tejidos

30 Los ratones se perfundieron a través del corazón con solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar toda la sangre. Para el experimento 1, los cerebros se cortaron a lo largo del plano coronal, se fijaron posteriormente en paraformaldehído al 4% seguido de sacarosa al 30%. Se cortaron secciones coronales de 20 µm utilizando un criostato. Para el experimento 2, los cerebros se cortaron sagitalmente a lo largo de la línea media y el hemisferio izquierdo se fijó posteriormente en paraformaldehído al 4% seguido de sacarosa al 30% y luego se seccionó en secciones de 20 µm utilizando un criostato. El hemisferio derecho (utilizado para ensayos bioquímicos) se cortó a lo largo del eje coronal utilizando una matriz de cerebro de ratón (Aparato de Harvard, Holliston, MA), y las regiones estriatal y cortical se diseccionaron utilizando un punzón de biopsia de 3 mm. A continuación, el tejido del cerebro se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C hasta su uso.

35 PCR cuantitativa en tiempo real (TaqMan)

40 Los niveles de ARN se midieron mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizaron punzones estriatales para todos los análisis de RT-PCR. El ARN total se extrajo utilizando el mini kit RNEasy de QIAGEN y luego se sometió a transcripción inversa y se amplificó utilizando el kit TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de RT-PCR cuantitativa de TaqMan se realizaron y analizaron en un sistema de PCR en tiempo real ABI PRISM® 7500 (Applied Biosystems). Los niveles de expresión de ARNm de *HTT* se normalizaron a niveles de ARNm de hipoxantina guanina fosforribosil transferasa 1 (*HPRT1*). Se generaron curvas estándares utilizando diluciones en serie de 5 veces de ADNc de cerebro de ratón. Cada una de las muestras se realizó por duplicado. La expresión génica relativa se determinó utilizando la curva estándar o el método $\Delta\Delta C_T$ y normalizando a los niveles de ARNm de *HPRT1*. Para la detección de *HTT*, humana se utilizaron los siguientes cebadores: 5' CTCCGTCCGGTAGACATGCT 3' y 5' CCATTTGAGGGTTCTGATTCC 3'. Para la detección de *HTT* de ratón se utilizaron los siguientes cebadores: 5' TGCTACACCTGACAGCGAGTCT 3' y 5' ATCCCTTGCGGGATCCTATCA 3'.

50 Transferencia Western

Los niveles de proteína se midieron mediante análisis del borrón de transferencia Western. Se utilizaron punzones corticales para todos los análisis del borrón de transferencia Western. Se homogeneizaron tejidos, a una concentración final de 50 mg/ml en tampón de lisis T-Per (Pierce) y que contenían el cóctel inhibidor de proteasa completo (Roche). Los homogeneizados se aclararon mediante centrifugación a 10.000 xg durante 6 min a 4°C. La concentración de proteína se midió utilizando el ensayo BSA (Pierce). De veinte a treinta microgramos de los homogeneizados se resolvieron en un gel tris-acetato al 3-8% de Novex y después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se sondaron con un anticuerpo monoclonal anti-huntingtina de ratón (Mab2166; dilución 1:2000, Millipore) y anticuerpo policlonal anti- β -tubulina de conejo (dilución 1:750, Santa Cruz Biotechnology). A continuación, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios infrarrojos (dilución 1:20.000, Rockland) y las proteínas se visualizaron mediante fluorescencia cuantitativa utilizando Odyssey (LI-COR Biosciences). Para controlar las variaciones de carga, la proteína Htt se normalizó a β -tubulina y se expresó como un porcentaje de animales no tratados o tratados con solución salina. Se utilizaron marcadores de peso molecular para verificar la identidad de las proteínas.

15 **Inmunohistoquímica**

Secciones de cerebro congeladas se tiñeron con anticuerpo anti-GFAP de conejo para teñir astrocitos (1:2500; DAKO, Glostrup, Alemania) o con anticuerpo anti-Iba1 para visualizar la microglía (1:500; WAKO Chemicals USA, Richmond, VA). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron anticuerpos de burro anti-especies específicos conjugados con FITC o Cy3. Las secciones se visualizaron utilizando un microscopio fluorescente Nikon Eclipse E800 (Nikon, Melville, NY).

Estadísticas

25 Los valores medios se utilizaron para los análisis estadísticos. Los datos se expresan como la media \pm EMT. Para los estudios que utilizaron dos grupos, se utilizó el test t de Student para la comparación estadística. Para las comparaciones de más de dos grupos, se utilizó ANOVA de una vía, seguido del test post-hoc de comparación múltiple de Tukey (Prism GraphPad). $p<0,05$ se consideró como una diferencia estadísticamente significativa.

30 **Resultados**

Como se describió arriba, los vectores AAV2-eGFP y AAV2HBKO-GFP se inyectaron en ratones de tipo salvaje en el Experimento 1 (Tabla 2). Todos los animales se sacrificaron 30 días después de la inyección. La microscopía de fluorescencia reveló que los vectores AAV2 y AAV2HBKO impulsaban la expresión del transgén de GFP en neuronas transducidas (**FIGS. 9A y 9B**). La expresión de GFP se limitó a la pista de inyección para AAV2, con una dispersión mínima más allá del sitio de inyección (**FIG. 9B**). Sin embargo, cuando se compara con el AAV2 tradicional, el AAV2HBKO condujo a una expresión de GFP más robusta y extensa, con expresión observada mucho más allá del sitio de inyección (**FIG. 9A**). Estos resultados demuestran la expresión robusta y generalizada de transgenes suministrados al SNC utilizando un vector AAV2HBKO.

40 **Ejemplo 4 de Referencia: Comparación de la expresión de GFP mediada por AAV2HBKO y AAV1 después de la inyección intraestriatal en cerebros de ratón YAC128**

Como se describió arriba, los vectores de serotipos AAV2HBKO y AAV1 se inyectaron en ratones YAC128 en el Experimento 2 (Tabla 3). Estos vectores impulsaron la expresión de un miARN artificial que fija como objetivo *HTT* humana y un informador de GFP. Los dos vectores AAV1 y AAV2HBKO mostraron una distribución robusta de GFP 30 días después de la inyección en el cuerpo estriado (**FIGS. 10A y 10B**). Sin embargo, el patrón de expresión de GFP apareció marcadamente diferente entre los dos serotipos de vector. La expresión de AAV1 de GFP (**FIG. 10A**) era más irregular y menos uniforme que la expresión de AAV2HBKO GFP (**FIG. 10B**). La transducción del vector parecía ser exclusivamente neuronal en los cerebros de AAV2HBKO en comparación con los serotipos de AAV1 que transducían tanto neuronas como células gliales, principalmente astrocitos. Estos resultados demuestran que AAV2HBKO mostró un perfil de expresión y transducción muy diferente en comparación con el AAV1 tradicional.

55 **Ejemplo 5 de Referencia: La inyección de AAV2HBKO-miARN-Htt en ratones YAC128 da como resultado la reducción del ARNm de HTT**

A continuación, se evaluó la capacidad de los serotipos de vector AAV1 y AAV2HBKO de expresar un miARN que silencia la expresión de *HTT* en el cuerpo estriado de ratones YAC128. Ratones adultos YAC128 recibieron inyecciones intraestriatales bilaterales de AAV2/1-miARN-Htt o AAV2HBKO-miARN-Htt, y se analizaron los cerebros 30 días después del tratamiento. Los niveles estriatales de ARNm de *HTT* humano mutante se redujeron significativamente en ratones a los que se inyectaron AAV2 1-miARN-Htt y AAV2HBKO-miARN-Htt cuando se compararon con controles no tratados (**FIG. 11A**). El análisis del borrón de transferencia Western de punciones del cerebro corticales mostró una tendencia hacia la reducción Htt en ambos grupos de tratamiento; sin embargo, la variabilidad en las muestras de control no tratadas impidió que los datos alcanzaran significancia estadística (**FIG. 11B**). Estos resultados demuestran la eficacia de la inactivación de genes por ARNi utilizando vectores AAV1 y AAV2HBKO.

Ejemplo 6 de Referencia: Inyección de AAV2HBKO-miARNHtt en ratones YAC128 no provoca neuroinflamación

5 Para determinar si inyecciones de AAV conferían neuroinflamación, se examinaron los niveles de los marcadores neuroinflamatorios de la proteína de carácter ácido fibrilar glial (GFAP, un marcador de astrocitos) e Iba1 (un marcador de microglia) 30 días después del tratamiento. No se observaron incrementos notables en los niveles de Iba1 después del tratamiento con AAV2HBKO, en comparación con los cerebros no tratados (véanse las FIGS. 12A y 12B). Sin embargo, el tratamiento con AAV2/1 provocó un aumento en los niveles de Iba1 en el sitio de inyección (FIG. 12C) que se ha observado previamente. No se observaron incrementos notables en los niveles de GFAP en ninguno de los cerebros tratados 30 días después de la inyección en comparación con los controles no tratados (FIGS. 13A-13C). Estos resultados indican que AAV2HBKO fue capaz de impulsar la expresión de un miARN dirigido hacia HTT humana y generar una reducción de HTT en ausencia de activación microglial, en comparación con el serotipo AAV1.

10 15 **Conclusiones**

Los serotipos actuales del vector AAV muestran una distribución limitada en el cerebro después de la administración en un solo sitio (*p. ej.*, Christine, C.W. et al. (2009) Neurology 73:1662-1669; Mandel, R.J. (2010) Curr. Opin. Mol. Ther. 12:240-247), como se comenta en detalle en esta memoria, los autores de la invención han descubierto que la administración de vectores AAV que tienen una unión reducida a proteoglicanos de heparán-sulfato (HSPG) en las superficies celulares potencia la transducción de AAV en el SNC. Estos resultados demuestran la utilidad de AAV que tiene la unión a HSPG modificada para la terapia génica del SNC en donde se desea una distribución generalizada del vector. Además, los autores de la invención también han descubierto que los vectores AAV2 que tienen una unión a HSPG reducida exhiben un perfil de seguridad ideal (ya que fijan exclusivamente como objetivo neuronas), al tiempo que logran una eficacia de transducción amplia y robusta. Por tanto, vectores de este tipo son útiles para indicaciones del SNC que requieren una transducción neuronal generalizada a partir de un suministro intraparenquimatoso.

Ejemplo 7 de Referencia: Transducción *in vitro* y subretiniana por vectores mutantes AAVrh8R y AAVrh8R

30 **Métodos**

Construcción del Plásmido Modificado de Arginina AAVrh8R

35 El plásmido rep/cap de AAVrh8R se mutó utilizando el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios Quikchange Lightning (Agilent Technologies). Se diseñó un cebador de mutagénesis por PCR para introducir cambios de alanina 586 en una arginina (AAVrh8R-A586R) o arginina 533 en una alanina (AAVrh8R-R533A). Los mutantes positivos se confirmaron mediante secuenciación.

40 **Generación de Vectores rAAV**

45 Se produjeron vectores AAV recombinantes que expresaban proteína fluorescente verde potenciada (EGFP) o híbrido de receptor de VEGF soluble (sFLT02) mediante transfección triple de células 293 utilizando los plásmidos rep/cap pAAVrh8R, pAAVrh8R-A586R o pAAVrh8R-R533A y pAdHelper. Los transgenes estaban bajo el control del promotor de β-actina de pollo (CBA).

50 **Ensayos de Transducción *in vitro***

55 Células HeLa, HeLaRC32 o NS1 se sembraron en placas de 24 pocillos (1 - 2 x 10⁵ células por pocillo). 24 horas después de la siembra, las células fueron infectadas con 1 x 10⁴ vg/célula - 1 x 10⁵ vg/célula (+) Ad5ts149. La eficiencia de transducción se midió 48 horas después de la infección por fluorescencia EGFP o por ELISA para cuantificar sFLT02 en el medio (ELISA VEGF R1 soluble humano de R&D Systems).

60 **Animales.**

55 Se adquirieron ratones C57BL/6 adultos obtenidos de Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME) y se mantuvieron en un vivero. Los animales tuvieron acceso libre a alimentos y agua durante el tiempo del estudio. Todos los procesos se realizaron bajo un protocolo aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales.

60 **Inyección Subretiniana.**

65 Se indujo midriasis y ciclopalejía con una aplicación tópica de Tropicamida (Alcon, Fort Worth, TX). El letargo se indujo y se mantuvo utilizando isoflurano al 3,5% portado en 800 mL/minuto de oxígeno suministrado al animal a través de un cono nasal. El ojo se inmovilizó con unas pinzas de punta anular (World Precision Instruments, Sarasota, FL) y se colocó una incisión piloto aproximadamente 2 mm por debajo del limbo en la esclerótica utilizando una aguja de calibre 30. Se dirigió una aguja de punta roma de calibre 33 a través de la incisión y se hizo avanzar posteriormente hasta que la punta penetró en la retina neurosensorial posterior. Se administró un microlitro de artículo de ensayo a lo largo

de un segundo. La aguja se mantuvo en su posición durante aproximadamente cinco segundos antes de retirarla. Se dejó que el animal se recuperara de la anestesia antes de regresar a su jaula.

Cuantificación de sFLT02 en lisados de retina.

5 Se midió sFLT02 en lisados de retina de ratón utilizando el kit ELISA VEGF R1 soluble humano de R&D Systems.

Resultados

10 Para investigar el papel de los residuos de arginina de la superficie de la cápside en la transducción de AAVrh8 de la retina, se generaron vectores AAVrh8 con proteínas de la cápside que portan mutaciones en los residuos que corresponden a las argininas de AAV2 implicadas en la unión a HSPG. La FIG. 14 compara cinco residuos de cápside críticos para la unión de AAV2 a HSPG con los residuos correspondientes en AAVrh8R. Como se muestra en la FIG. 15, se construyeron dos mutantes AAVrh8R, cada uno portando una sustitución de aminoácidos en estos residuos: A586R y R533A (la numeración se basa en la secuencia de aminoácidos de VP1).

15 Para evaluar el efecto de añadir residuos de arginina a la cápside de AAVrh8R en la transducción *in vitro*, se infectaron células HeLa con AAVrh8R-sFLT02 o un vector AAVrh8R-A586R-sFLT02 modificado que tiene una arginina añadida en la posición A586 (AAVrh8R A586R), ambos a razón de 1×10^4 DRP/célula. 48 horas después de la infección, se evaluó la eficacia de la transducción midiendo sFLT02 en el medio de cultivo celular. El AAVrh8R-A586R exhibió una transducción varias veces mayor en comparación con el AAVrh8R sin modificar (FIG. 16A).

20 Para evaluar el efecto de la eliminación de la cápside, argininas en transducción *in vitro*, las células HeLaRC32 se infectaron ya sea con el vector AAVrh8R o el vector AAVrh8R-R533A (ambos a 1×10^4 DRP/célula). AAVrh8R-R533A tenía una transducción significativamente reducida en comparación con AAVrh8R (FIG. 16B).

25 Se llevaron a cabo experimentos similares utilizando la expresión de EGFP como medida de la eficacia de la transducción. AAVrh8R-A586R-EGFP exhibió una transducción sustancialmente mejorada de células NS1 en comparación con AAVrh8R (compárese la FIG. 17B con la FIG. 17A). Por el contrario, el vector AAVrh8R-R533A-EGFP tenía una transducción reducida en células HeLa en comparación con AAVrh8R (compárese la FIG. 17D con la FIG. 17C).

30 En conjunto, estos experimentos sugieren que la adición de argininas a la cápside de AAVrh8R mejora la transducción *in vitro* de AAVrh8R, mientras que la eliminación de argininas de la cápside de AAVrh8R altera la transducción *in vitro*. Estos resultados demuestran que la transducción *in vitro* por AAVrh8R está fuertemente influenciada por residuos de arginina en la cápside.

35 Para determinar el efecto de argininas en la transducción subretinal de AAVrh8R, a los ratones C57B16 se les inyectaron 1×10^8 DRP de AAVrh8R, AAVrh8R-A586R o AAVrh8R-R533A que expresan sFLT02 a partir del promotor de CBA. Los ratones fueron sacrificados 30 días después de la administración del vector y se midió sFLT02 en los lisados de retina.

40 La transducción de AAVrh8R-A586R de la retina de ratón se redujo sustancialmente en comparación con AAVrh8R y, de hecho, fue equiparable a AAV2, que también tiene una arginina en esta misma posición, R585 (FIG. 18A). La transducción de AAVrh8R-R533A de la retina de ratón mejoró en comparación con AAVrh8R (FIG. 18B).

45 Estos datos destacan la influencia de las argininas de la cápside en la transducción subretiniana de AAVrh8R y sugieren que la transducción subretiniana se mejora mediante la eliminación de argininas de la cápside de AAVrh8R. Estos resultados demuestran que la transducción subretiniana por AAVrh8R está fuertemente influenciada por residuos de arginina en la cápside.

Ejemplo 8 de Referencia: La transducción intravítrea de AAVrh8R se mejora mediante la adición de arginina en la posición 586

55 Métodos

Inyección intravítrea

60 El letargo se indujo y se mantuvo utilizando isoflurano al 3,5% portado en 800 mL/minuto de oxígeno suministrado al animal a través de un cono nasal. Se inyectó un microlitro de artículo de ensayo en el humor vítreo utilizando una jeringa Hamilton equipada con una aguja biselada de calibre 33 (Hamilton Co., Reno, NV). La aguja se dirigió a través de la esclerótica aproximadamente 2 mm por debajo del limbo y se hizo avanzar con cuidado hacia la cámara vítreo para evitar el contacto con el cristalino. El artículo de ensayo se suministró a lo largo de un período de 1-2 segundos. Despues de la inyección, la aguja se mantuvo en su posición durante aproximadamente cinco segundos antes de retirarla. Se dejó que el animal se recuperara de la anestesia antes de regresar a su jaula.

Cuantificación de sFLT02 en lisados de retina

Se midió sFLT02 en lisados de retina de ratón utilizando el kit ELISA VEGF R1 soluble humano de R&D Systems.

5 Resultados

Para evaluar el efecto de la adición de argininas a la cápside de AAV sobre la transducción intravítreo, a ratones C57B16 se les inyectaron 1×10^9 DRP de AAV2, AAVrh8R o AAVrh8R-A586R, cada uno portando una construcción que expresa sFLT02 a partir del promotor de CBA. Los ratones fueron sacrificados 30 días después de la administración del vector y se midió sFLT02 en los lisados de retina. La transducción de AAVrh8R-A586R de la retina de ratón se mejoró sustancialmente en comparación con AAVrh8R y, de hecho, fue equiparable a AAV2, que también tiene una arginina en esta misma posición, R585 (**FIG. 19**). Estos datos indican que la transducción intravítreo de la retina se puede mejorar mediante la adición de argininas a la cápside de AAV. En base a estos resultados y la homología de secuencia entre las cápsides de AAV (**FIG. 20**), la transducción intravítreo de la retina por partículas de AAV que portan cápsides de AAV1, AAV6, AAV8, AAV9 y AAVrh10 puede mejorar de forma similar la transducción retiniana.

SECUENCIAS

20 Todas las secuencias de polipéptidos se presentan en posición N-terminal a C-terminal, a menos que se indique lo contrario. Todas las secuencias nucleicas se presentan de 5' a 3', a menos que se indique lo contrario.

Secuencia de aminoácidos de AAV2 VP1

MAADGYLPOWLEDTILSEGIRQWWKLKGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNE
 ADAAAALEHDKAYDRQLSGDNPYLKYNHADAEPQERLKEDETSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVE
 EPVKTAPGKRPVHESPVPEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNPGQQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTN
 TMATGSGAPMADNNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVTTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGAS
 NDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHSPRDWQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVITQNDGTTIANN
 LTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPPADVFMVPQYGYLTNNNGSQAVGRSSPYCLEYFPSQML
 RTGNNFTFSYTFEDVPHISSYAHQSLDRLMNPLIDQYLYYLRSRTNTPSGTTTQSRLQPSQAGASDIRDQ
 SRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYBLNGRDSLVPGPAMASHKDDEEKFPQSGVL
 IPKGKQGSEKTNVDIEKVMTDEEEIRTTPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQ
 DRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTSAAKFASFTIQYSTGQ
 VSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:1)

Secuencia de aminoácidos de AAV2 VP1 HBKO

MAADGYLPOWLEDTILSEGIRQWWKLKGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEPVNE
 ADAAAALEHDKAYDRQLSGDNPYLKYNHADAEPQERLKEDETSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVE
 EPVKTAPGKRPVHESPVPEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNPGQQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTN
 TMATGSGAPMADNNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVTTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGAS
 NDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHSPRDWQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVITQNDGTTIANN
 LTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPPADVFMVPQYGYLTNNNGSQAVGRSSPYCLEYFPSQML
 RTGNNFTFSYTFEDVPHISSYAHQSLDRLMNPLIDQYLYYLRSRTNTPSGTTTQSRLQPSQAGASDIRDQ
 SRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYBLNGRDSLVPGPAMASHKDDEEKFPQSGVL
 IPKGKQGSEKTNVDIEKVMTDEEEIRTTPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATAADVNTQGVLPGMVWQ
 DRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTSAAKFASFTIQYSTGQ
 VSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:2)

30

Secuencia de aminoácidos de AAV2 VP2

MAPGKKRPVHESPVPEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNPGQQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMA
 TGSGAPMADNNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVTTTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDN
 HYFGYSTPWGYFDFNRFHCHSPRDWQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVITQNDGTTIANNLS
 TVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPPADVFMVPQYGYLTNNNGSQAVGRSSPYCLEYFPSQMLRTG
 NNFTFSYTFEDVPHISSYAHQSLDRLMNPLIDQYLYYLRSRTNTPSGTTTQSRLQPSQAGASDIRDQSRN
 WLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYBLNGRDSLVPGPAMASHKDDEEKFPQSGVLIPG
 KQGSEKTNVDIEKVMTDEEEIRTTPVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRD
 VYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTSAAKFASFTIQYSTGQVSVE
 BEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:3)

35

Secuencia de aminoácidos de AAV2 VP2 HBKO

MAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGTAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDQPQLGQPPAAPSGLGTNTMA
TGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDN
HYFGYSTPWGYFDIFNRFHCHPSPRDWQRLLNNWGRPKRLNFKLNFNIQVKEVITQNDGTTIANNLTS
TVQVPTDSEYQLPYVLGSABQGCLPPFPADVPMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTG
NNFTFSYTFEDVPPHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYYLTSRNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRN
WLPGPCYRQQRVSKEITSADNNNSEYSEWTGATKYHLNGRDSLNVNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLI
FGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQD
RDVYLQGPIWAKIPTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVANPSTTFSAAKFASPTIQYSTGQVS
VEIEWELQKENSKRWNPEIQTTSYNKSVNDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:4)

Secuencia de aminoácidos de AAV2 VP3

MATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASN
DNHYFGYSTPWGYFDIFNRFHCHPSPRDWQRLLNNWGRPKRLNFKLNFNIQVKEVITQNDGTTIANNL
TSTVQVPTDSEYQLPYVLGSABQGCLPPFPADVPMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLR
TGNNNFTSYTFEDVPPHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYYLTSRNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRN
RNWLPGPCYRQQRVSKEITSADNNNSEYSEWTGATKYHLNGRDSLNVNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLI
FGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQD
RDVYLQGPIWAKIPTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVANPSTTFSAAKFASPTIQYSTGQVS
VEIEWELQKENSKRWNPEIQTTSYNKSVNDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:5)

Secuencia de aminoácidos de AAV2 VP3 HBKO

MATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASN
DNHYFGYSTPWGYFDIFNRFHCHPSPRDWQRLLNNWGRPKRLNFKLNFNIQVKEVITQNDGTTIANNL
TSTVQVPTDSEYQLPYVLGSABQGCLPPFPADVPMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLR
TGNNNFTSYTFEDVPPHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYYLTSRNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRN
RNWLPGPCYRQQRVSKEITSADNNNSEYSEWTGATKYHLNGRDSLNVNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLI
FGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQD
RDVYLQGPIWAKIPTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVANPSTTFSAAKFASPTIQYSTGQVS
VEIEWELQKENSKRWNPEIQTTSYNKSVNDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:6)

Secuencia de aminoácidos de AAV3 VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLGPNGNLDKGEP
VNEADAAAEEHDKAYIDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVPQAKKRILEPL
GLVFEAAKTAPGKKRPVDQSPQEPDSSSGVKGSKQ PARKRLNFGQTGDSESVPDPQQLGEPPAAPT
SLGSNTMASGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQIS
SQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDIFNRFHCHPSPRDWQRLLNNWGRPKKLSPKLNPNIQVKEVITQND
GTTIANNLSTVQVPTDSEYQLPYVLGSABQGCLPPFPADVPMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYC
LEYFPSQMLRTGNNPQSYTFEDVPPHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYYLNRQTSGTTNQSRLL
FSQAGPQSMSLQARNWLPGPCYRQQRSLKTAANDNNNSNFPWTAAASKYHLNGRDSLNVNGPAMASH
KDDEEKFFPMHGHNLPGKEGTTASN AELDNVMITDEEEIRTTNPVATEQYGTVANNLOSSNTAPTT
VNNDQGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVANPPTTF
SPAKFASPTIQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQTTSYNKSVNDFTVDTNGVYSEPRPIGTRY
YLTRNL (SEQ ID NO:7)

15 ITR mutado para vectores scAAV

CACICCCCTCTGC CGCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGGTGGCCCACGCCCOGG
GCTTGCCCCGGCG (SEQ ID NO:8)

Secuencia de aminoácidos de AAVrh8R VP1

20

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEP
VNAADAAALIHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLIEP
LGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNPGQTGDSESVPDPPQPLGEPPAAPS
GLGPNTMASGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQIS
NGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNFHCHFSPRDWQRLINNNWGRPKRNLNFKLNFNLIQVKEVTT
NEGTKTIANLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQALGRSSF
YCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLYYLVRTQTTGTGCTQTL
AFSQAGPSSMANQARNWVPGPCYRQQRVSTTNQNNSNFAWTGAAKFKLNGRDSLMNPVGAMA
SHKDDDEDRFPSSGVLIIGKQGAGNDGVVDYSQVLITDEEEIKATNPVATEEYGAVAINNQRANTQAQ
TGLVHNQGVIPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPP
LTFNQAKLNSFTIQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPI
GTRYLTRNL (SEQ ID NO:9)

Secuencia de aminoácidos de AAVrh8R A586R mutante VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEP
VNAADAAALIHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLIEP
LGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNPGQTGDSESVPDPPQPLGEPPAAPS
GLGPNTMASGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQIS
NGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNFHCHFSPRDWQRLINNNWGRPKRNLNFKLNFNLIQVKEVTT
NEGTKTIANLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQALGRSSF
YCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLYYLVRTQTTGTGCTQTL
AFSQAGPSSMANQARNWVPGPCYRQQRVSTTNQNNSNFAWTGAAKFKLNGRDSLMNPVGAMA
SHKDDDEDRFPSSGVLIIGKQGAGNDGVVDYSQVLITDEEEIKATNPVATEEYGAVAINNQRANTQAQ
TGLVHNQGVIPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPP
LTFNQAKLNSFTIQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPI
GTRYLTRNL (SEQ ID NO:10)

5

Secuencia de aminoácidos de AAVrh8R R533A mutante VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEP
VNAADAAALIHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLIEP
LGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNPGQTGDSESVPDPPQPLGEPPAAPS
GLGPNTMASGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQIS
NGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNFHCHFSPRDWQRLINNNWGRPKRNLNFKLNFNLIQVKEVTT
NEGTKTIANLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQALGRSSF
YCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVPHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLYYLVRTQTTGTGCTQTL
AFSQAGPSSMANQARNWVPGPCYRQQRVSTTNQNNSNFAWTGAAKFKLNGRDSLMNPVGAMA
SHKDDDEDRFPSSGVLIIGKQGAGNDGVVDYSQVLITDEEEIKATNPVATEEYGAVAINNQRANTQAQ
TGLVHNQGVIPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPP
LTFNQAKLNSFTIQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPI
GTRYLTRNL (SEQ ID NO:11)

10

Secuencia de aminoácidos de AAV1 VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGEP
KGEPVNAADAAALIHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKTGQQPAKKRLNPGQTGDSE
SVPDPPQPLGEPPATPAAVGPTTMASGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVI
TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDHYFGYSTPWGYFDNFHCHFSPRDWQRL
INNNWGRPKRNLNFNLIQVKEVTTNDGVITIANNLTSTVQVPSDSEYQLPYVLGSAHQ
GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEEVP
PHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLYYLRTQNSQSGAQNKLILFSRGSPAGMSVQPKNWLP
GPCYRQQRVSKTKTDNNNSNETWTGASKYNLNGRESIINPGTAMASHKDDEDKFFPMGV
MIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERPGTVAVNFQSSSTDPATGDVHAMG
ALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPA
EPSATKFASFTIQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYYAKSANVDFTVDNNGL
YTEPRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO:12)

Secuencia de aminoácidos de AAV6 VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPENGLD
 KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEGFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
 AKKRVLEPFGLVVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSGIGKTGQQPAKKRILNGQTGDSE
 SVPDPQPLGEPPATPAAVGPTTMASGGGAPMADNNNEGADGVGNASONWHCDSTWLGDRVI
 TTSTRTWALPTYNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHPSRDWQRL
 INNWGFRPKRLNPKLIPNIQVKEVTDNDGVTHANNLTSTVQVFSDEYQLPYVLGSAHQ
 GCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVERSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVP
 FHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLYYLNRTQNQSGSAQNQKDLLPSRGSPAGMSVQPKNWLP
 GPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWIGASKYNLNGRESHNPGTAMASHKDDKDFFFMSGV
 MIFGKESAGASNTALDNVMITDEEEIKATNPVATERFGTVAVNLQSSSTDPAATGDVHVMG
 ALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPTDGFHPSPLMGGFGLKHPPPQILJKNTPV PANPPA
 EPSATKFASITIQYSTGQSVIEWELQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDITVDNNGL
 YTEPRPIGTRYLTRPL (SEQ ID NO:13)

5

Secuencia de aminoácidos de AAV8 VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPENGLD
 KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEGFQERLQEDTSFGGNLGRAVPQ
 AKKRVLEPGLVVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSGIGKTGQQPAKKRILNGQTGDSE
 SVPDPQPLGEPPAAPSGVGPNMTMAAGGGAPMADNNNEGADGVGSSGNWHCDSTWLGDRV
 ITTSTRTWALPTYNHLYKQISNGTSGATNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHPSRDWQ
 RLINNNWGFRPKRLNPKLIPNIQVKEVTDNGTQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGS
 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVERSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFTYTFED
 VPFHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQPTCGTANTQTLGPSQGGPNTMANQAKNW
 LPGPCYRQQRVSTTGTQNNNSNFAWTAGTKYH.LNQRNSLANPGIAMATHKDDEERFFPSN
 GILIFGKQNAARDNADYSDVMLTSEEETKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTVNS
 QGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPTDGFHPSPLMGGFGLKHPPPQILJKNTPV PADP
 PTTFNQSKLNSITIQYSTGQSVIEWELQKENSKRWNPEIQTNSYYKSTSVDFAVNTE
 GVYSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:14)

Secuencia de aminoácidos de AAV9 VP1

10

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPENGLD
 KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEGFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
 AKKRLLEPGLVVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRILNGQTGDTE
 SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNNEGADGVGSSGNWHCDSQWLGDRVI
 TTSTRTWALPTYNHLYKQISNSTSGOSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHPSRDWQR
 LINNWGFRPKRLNPKLIPNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGS
 EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTNDGSQAVERSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
 PPHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNNQTLKPSVAGPSNMAVQGRNYIP
 GPSYRQQRVSTTGTQNNNSEAWPGASSWALNQRNSLMNPGPAMASBKEGEDRFFPLSGS
 LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGVATNHQSAQAAQATGWVQNQG
 ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPTDGFHPSPLMGGFGMKHPPPQILJKNTPV PADPPT
 APNQDKLNSITIQYSTGQSVIEWELQKENSKRWNPEIQTNSYYKSNNVEFAVNTEGV
 YSEPRPIGTRYLTRNL (SEQ ID NO:15)

Secuencia de aminoácidos de AAVrh10 VP1

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFPNGLD
 KGEPVNAADAAALEHDKAJDQLKAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAVHQ
 AKKRVLEPLGLVEEGAKTAPOKKRVEPSPQRSPDSSTGIGKKQQPAKKRLNFGQTGDS
 ESVPDPQPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDWR
 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
 RLINNNWGFRPKRLNFKLPNIQVKEVTNQNEGTTIANLTSTIQTSEYQLPYVLGSA
 HQGCLPPPFPADVFMPQYGYLTLNNGSQAVERSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYQFED
 VPFHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTQSTGGTAGTQQLFSQAGPNNMSAQAKNW
 LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNPAWTGATKYHLNGRDSLVNPGVAMATHKDDPERFPSS
 GVLMPGKQGAGKDNDYSSVMLTSHEEIKTINPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNS
 QGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGFFGLKHPPPQILIKNTPVPADP
 PTIFSQAKLASITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTD
 GTYSEPRPICTRYLTRNL (SEQ ID NO:16)

LISTA DE SECUENCIAS

5

- <110> Genzyme Corporation
- Scaria, Abraham
- Sullivan, Jennifer
- 10 Stanek, Lisa M.
- <120> Vectores AAV Para la Terapia Génica de la Retina y el SNC
- <130> 159792010440
- <140> Aún No Asignado
- 15 <141> Concurrentemente con el Mismo
- <150> US 62/114,575
- <151> 2015-02-10
- <150> US 61/988,131
- <151> 2014-05-02
- <160> 16
- 20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 735
- <212> PRT
- <213> Virus adeno-asociado
- 25 <400> 1

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
 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 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 Gly Thr Gly
 145 150 155 160
 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 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
 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 Ser Arg Thr
 435 440 445
 Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
 450 455 460
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
 465 470 475 480
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn
 485 490 495
 Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly
 500 505 510
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp
 515 520 525
 Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys
 530 535 540
 Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
 545 550 555 560
 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr
 565 570 575
 Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr
 580 585 590
 Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
 595 600 605
 Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
 610 615 620
 Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
 625 630 635 640
 His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn
 645 650 655
 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> 2
<211> 735
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> Construcción Sintética
<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
 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 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
 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 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
 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 Ser Arg Thr

435	440	445
Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gin Phe Ser Gln		
450	455	460
Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly		
465	470	475
Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn		
485	490	495
Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly		
500	505	510
Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp		
515	520	525
Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys		
530	535	540
Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr		
545	550	555
Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr		
565	570	575
Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Ala Gly Asn Ala Gln Ala Ala Thr		
580	585	590
Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp		
595	600	605
Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr		
610	615	620
Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys		
625	630	635
His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn		
645	650	655
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
Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu		
725	730	735

<210> 3

<211> 598

5

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado

<400> 3

Met Ala Pro Gly Lys Arg Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro		
1	5	10
Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys		
20	25	30
Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro		
35	40	45
Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn		
50	55	60
Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly		
65	70	75
Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr		
85	90	95
Trp Met Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu		
100	105	110
Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly		
115	120	125
Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr		
130	135	140

Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln
 145 150 155 160
 Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe
 165 170 175
 Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr
 180 185 190
 Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
 195 200 205
 Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys
 210 215 220
 Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr
 225 230 235 240
 Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr
 245 250 255
 Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe
 260 265 270
 Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
 275 280 285
 His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
 290 295 300
 Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln
 305 310 315 320
 Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln
 325 330 335
 Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser
 340 345 350
 Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala
 355 360 365
 Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro
 370 375 380
 Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser
 385 390 395 400
 Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp
 405 410 415
 Ile Glu Lys Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn
 420 425 430
 Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg
 435 440 445
 Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu
 450 455 460
 Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile
 465 470 475 480
 Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu
 485 490 495
 Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
 500 505 510
 Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys
 515 520 525
 Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu
 530 535 540
 Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu
 545 550 555 560
 Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr
 565 570 575
 Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg
 580 585 590
 Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 595

<210> 4
<211> 598
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> Construcción Sintética
<400> 4

Met Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro
 1 5 10 15
 Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys
 20 25 30
 Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro
 35 40 45
 Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn
 50 55 60
 Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly
 65 70 75 80
 Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr
 85 90 95
 Trp Met Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu
 100 105 110
 Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly
 115 120 125
 Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
 130 135 140
 Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln
 145 150 155 160
 Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe
 165 170 175
 Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr
 180 185 190
 Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
 195 200 205
 Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys
 210 215 220
 Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr
 225 230 235 240
 Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr
 245 250 255
 Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe
 260 265 270
 Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
 275 280 285
 His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
 290 295 300
 Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln
 305 310 315 320
 Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln
 325 330 335
 Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser
 340 345 350
 Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala
 355 360 365
 Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro
 370 375 380
 Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser
 385 390 395 400
 Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp
 405 410 415
 Ile Glu Lys Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn
 420 425 430
 Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Ala
 435 440 445
 Gly Asn Ala Gln Ala Ala Thr Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu

450	455	460
Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile		
465	470	475
Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu		
485	490	495
Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys		
500	505	510
Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys		
515	520	525
Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu		
530	535	540
Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu		
545	550	555
Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr		
565	570	575
Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg		
580	585	590
Tyr Leu Thr Arg Asn Leu		
595		

<210> 5

<211> 533

5

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado

<400> 5

Met Ala Thr Gly Ser Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala
 1 5 10 15
 Asp Gly Val Gly Asn Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp
 20 25 30
 Met Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro
 35 40 45
 Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala
 50 55 60
 Ser Asn Asp Asn His Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe
 65 70 75 80
 Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg
 85 90 95
 Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys
 100 105 110
 Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr
 115 120 125
 Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser
 130 135 140
 Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu
 145 150 155 160
 Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu
 165 170 175
 Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys
 180 185 190
 Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr
 195 200 205
 Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His
 210 215 220
 Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Gln Ser
 245 250 255
 Arg Leu Gln Phe Ser Gln Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser
 260 265 270
 Arg Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys
 275 280 285

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

<210> 6

<211> 533

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 6

10

Met Ala Thr Gly Ser Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala
 1 5 10 15
 Asp Gly Val Gly Asn Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp
 20 25 30
 Met Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro
 35 40 45
 Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala
 50 55 60
 Ser Asn Asp Asn His Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe
 65 70 75 80
 Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg
 85 90 95
 Leu Ile Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys
 100 105 110
 Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr
 115 120 125
 Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser
 130 135 140
 Glu Tyr Gin Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gin Gly Cys Leu
 145 150 155 160

Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu
 165 170 175
 Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys
 180 185 190
 Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr
 195 200 205
 Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His
 210 215 220
 Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser
 245 250 255
 Arg Leu Gln Phe Ser Gln Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser
 260 265 270
 Arg Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys
 275 280 285
 Thr Ser Ala Asp Asn Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr
 290 295 300
 Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala
 305 310 315 320
 Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly
 325 330 335
 Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile
 340 345 350
 Glu Lys Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro
 355 360 365
 Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Ala Gly
 370 375 380
 Asn Ala Gln Ala Ala Thr Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro
 385 390 395 400
 Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
 405 410 415
 Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met
 420 425 430
 Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
 435 440 445
 Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe
 450 455 460
 Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile
 465 470 475 480
 Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile
 485 490 495
 Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val
 500 505 510
 Asp Thr Asn Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr
 515 520 525
 Leu Thr Arg Asn Leu
 530

<210> 7

<211> 736

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado

<400> 7

ES 2 879 636 T5

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu 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
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala		80
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 Arg		
130	135	140
Pro Val Asp Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Val Gly		
145	150	155
Lys Ser Gly Lys Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr		160
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
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
Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly 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
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
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	560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gin
 565 570 575
 Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gin Ser Ser Asn Thr Ala Pro Thr
 580 585 590
 Thr Arg Thr Val Asn Asp 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
 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> 8

<211> 78

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 8

10 cactccctct ctgcgcgcac gctcgctcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccacgc 60
ccgggctttg cccgggcg 78

<210> 9

<211> 736

15 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 9

20 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu 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 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 Gin 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
 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 Ala Pro Ser Gly Leu Gly Pro 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 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 Asn Gly Thr Ser Gly 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 Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320
 Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala Asn
 325 330 335
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr 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
 Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn
 370 375 380
 Gly Ser Gln Ala Leu 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 Thr
 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 Val
 435 440 445
 Arg Thr Gln Thr Thr Gly Thr Gly Thr Gln Thr Leu Ala Phe Ser
 450 455 460
 Gln Ala Gly Pro Ser Ser Met Ala Asn Gln Ala Arg Asn Trp Val Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Asn Gln Asn
 485 490 495
 Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Ala Lys Phe Lys Leu Asn
 500 505 510
 Gly Arg Asp Ser Leu Met Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 Asp Asp Glu Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly
 530 535 540
 Lys Gln Gly Ala Gly Asn Asp Gly Val Asp Tyr Ser Gln Val Leu Ile
 545 550 555 560
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu
 565 570 575
 Tyr Gly Ala Val Ala Ile Asn Asn Gln Ala Ala Asn Thr Gln Ala Gln
 580 585 590
 Thr Gly Leu Val His Asn Gln Gly Val Ile Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605
 Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620
 Thr Asp Glu Asn 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

ES 2 879 636 T5

645	650	655
Asp Pro Pro Leu Thr Phe Asn Gln Ala 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 Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val		
705	710	715
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu		
725	730	735

<210> 10

<211> 736

5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 10

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

	325	330	335												
Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	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	
Ala	Asp	Val	Phe	Met	Val	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asn
				370				375						380	
Gly	Ser	Gln	Ala	Leu	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe
				385				390						395	
Pro	Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Phe	Ser	Tyr	Thr
				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	Val
				435				440						445	
Arg	Thr	Gln	Thr	Thr	Gly	Thr	Gly	Gly	Thr	Gln	Thr	Leu	Ala	Phe	Ser
				450				455						460	
Gln	Ala	Gly	Pro	Ser	Ser	Met	Ala	Asn	Gln	Ala	Arg	Asn	Trp	Val	Pro
				465				470						475	
Gly	Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Thr	Asn	Gln	Asn
				485				490						495	
Asn	Asn	Ser	Asn	Phe	Ala	Trp	Thr	Gly	Ala	Ala	Lys	Phe	Lys	Leu	Asn
				500				505						510	
Gly	Arg	Asp	Ser	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	Val	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys
				515				520						525	
Asp	Asp	Glu	Asp	Arg	Phe	Phe	Pro	Ser	Ser	Gly	Val	Leu	Ile	Phe	Gly
				530				535						540	
Lys	Gln	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Gly	Val	Asp	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Ile
				545				550						555	
Thr	Asp	Glu	Glu	Ile	Lys	Ala	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	
				565				570						575	
Tyr	Gly	Ala	Val	Ala	Ile	Asn	Asn	Gln	Arg	Ala	Asn	Thr	Gln	Ala	Gln
				580				585						590	
Thr	Gly	Leu	Val	His	Asn	Gln	Gly	Val	Ile	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln
				595				600						605	
Asn	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	Leu
				625				630						635	
Lys	His	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile	Lys	Asn	Thr	Pro	Val	Pro	Ala
				645				650						655	
Asp	Pro	Pro	Leu	Thr	Phe	Asn	Gln	Ala	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	Thr	Asn	Val	Asp	Phe	Ala	Val	Asn	Thr	Glu	Gly	Val
				705				710						715	
Tyr	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Ile	Gly	Thr	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg	Asn	Leu
				725				730						735	

<210> 11
<211> 736
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 11

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	Glu	Trp	Trp
Asp	Leu	Lys	Pro
Gly	Ala	Pro	Lys
20	25	30	
Lys	Ala	Asn	Gln
Gln	Gln	Lys	Gln
Asp	Asp	Gly	Arg
Tyr	Tyr	Leu	Gly
Pro	Phe	Asn	Gly
50	55	60	
Val	Asn	Ala	Ala
Asp	Ala	Ala	Leu
Glu	His	Asp	Lys
65	70	75	80
Gln	Gln	Leu	Lys
Ala	Gly	Asp	Asn
Asp	Tyr	Leu	Arg
95			
Asn	Gln	Ala	Tyr
Leu	Gly	Asp	Asn
100	105	110	
Asp	Ala	Glu	Phe
Gln	Glu	Arg	Gly
115	120	125	
Asn	Leu	Gly	Arg
Leu	Val	Phe	Gln
130	135	140	
Pro	Val	Glu	Gln
145	150	155	160
Lys	Thr	Gly	Gln
Gln	Gln	Pro	Ala
165	170	175	
Gly	Asp	Ser	Glu
180	185	190	
Ala	Ala	Pro	Ser
195	200	205	
Ala	Pro	Met	Ala
Asp	Asn	Asn	Glu
210	215	220	
Ser	Gly	Asn	Trp
225	230	235	240
Thr	Thr	Ser	Thr
Arg	Trp	Ala	Leu
245	250	255	
Tyr	Lys	Gln	Ile
260	265	270	
Thr	Tyr	Phe	Gly
275	280	285	
Phe	His	Cys	His
290	295	300	
Asn	Trp	Gly	Phe
305	310	315	320
Gln	Val	Lys	Glu
325	330	335	
Asn	Leu	Thr	Ser
340	345	350	
Pro	Tyr	Val	Leu
355	360	365	
Ala	Asp	Val	Phe
370	375	380	
Gly	Ser	Gln	Ala
385	390	395	400
Pro	Ser	Gln	Met
405	410	415	
Phe	Glu	Asp	Val
420	425	430	
Asp	Arg	Leu	Met
435	440	445	
Arg	Thr	Gln	Thr
450	455	460	
Gln	Ala	Gly	Pro
465	470	475	480
Gly	Pro	Cys	Tyr
485	490	495	
Asn	Asn	Ser	Asn
500	505	510	

ES 2 879 636 T5

Gly Arg Asp Ser Leu Met Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 Asp Asp Glu Asp Ala Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly
 530 535 540
 Lys Gln Gly Ala Gly Asn Asp Gly Val Asp Tyr Ser Gln Val Leu Ile
 545 550 555 560
 Thr Asp Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu
 565 570 575
 Tyr Gly Ala Val Ala Ile Asn Asn Gln Ala Ala Asn Thr Gln Ala Gln
 580 585 590
 Thr Gly Leu Val His Asn Gln Gly Val Ile Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605
 Asn 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 Leu
 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 Leu Thr Phe Asn Gln Ala 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 Thr Asn Val Asp 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> 12

<211> 736

5

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado

<400> 12

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu 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 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
 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
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu		240
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		285
275	280	
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
Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn		320
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
Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe		400
405	410	415
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
Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn		480
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
Thr Asp Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg		560
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
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
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

ES 2 879 636 T5

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

<210> 13
<211> 736
5 <212> PRT
<213> Virus adeno-asociado
<400> 13

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asn 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 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
 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
 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
 Glu Asp 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
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 Lys 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
Thr Asp Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val	Ala Thr Glu Arg	
565	570	575
Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser Ser Ser	Thr Asp Pro Ala	
580	585	590
Thr Gly Asp Val His Val 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
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
Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr	Leu Thr Arg Pro Leu	
725	730	735

<210> 14
 <211> 738
 <212> PRT
 <213> Virus adeno-asociado
 <400> 14

ES 2 879 636 T5

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala 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
 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 Thr Ala Asn Thr Gln Thr Leu Gly
 450 455 460
 Phe Ser Gln 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 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 Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
 565 570 575
 Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln 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

ES 2 879 636 T5

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

5

<210> 15
<211> 736
<212> PRT
<213> Virus adeno-asociado
<400> 15

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu 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
 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 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
 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
 Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
 545 550 555 560
 Thr Asn 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> 16

<211> 738

<212> PRT

ES 2 879 636 T5

<213> Virus adeno-asociado
<400> 16

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
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 Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile		
145	150	155
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln		
165	170	175
Thr Gly Asp 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
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
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 Asn Phe Lys Leu Phe Asn		
305	310	315
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
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr		
405	410	415
Gln 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 Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu		
450	455	460
Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp		
465	470	475
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

ES 2 879 636 T5

His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
530 535 540
Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
545 550 555 560
Met Leu Thr Ser 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 Asn Ala Ala
580 585 590
Pro Ile Val Gly Ala 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 Asp
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 de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) para uso en un método de tratar un trastorno ocular en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar un ácido nucleico heterólogo al ojo de un individuo, en donde dicho método comprende administrar dicha partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) a la subretina del individuo, en donde la partícula de rAAV comprende
 - a) una cápside de AAV2 recombinante (rAAV2) que comprende proteínas de la cápside de AAV2 que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más de las posiciones R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2,
 - en donde la una o más sustituciones de aminoácidos es con un residuo de aminoácido hidrófobo, y
 - en donde la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV a un proteoglicano de heparán sulfato, y
 - b) un vector rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV.
2. Una composición que comprende una partícula de virus adeno-asociado recombinante (rAAV) para uso en un método para tratar un trastorno ocular en un individuo, en donde dicho método comprende el suministro subretiniano de dicha composición a la retina del individuo, en donde las partículas de rAAV comprenden
 - a) una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de AAV2 que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más de las posiciones R484, R487, K527, K532, R585 y/o R588, numeración basada en la numeración VP1 de AAV2,
 - en donde la una de más sustituciones de aminoácidos es con un residuo de aminoácido hidrófobo, y
 - en donde la una o más sustituciones de aminoácidos reduce la unión de la partícula de rAAV a un proteoglicano de heparán sulfato, y
 - b) un vector rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal de AAV.
3. La partícula de rAAV para uso de acuerdo con la reivindicación 1, o la composición para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el ácido nucleico heterólogo está enlazado operativamente a un promotor adecuado para la expresión de un polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico en uno o más tipos de células de la retina.
4. La partícula de rAAV para uso de acuerdo con la reivindicación 3, la composición para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la célula de la retina es una célula fotorreceptora.
5. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde el ácido nucleico heterólogo se utiliza para tratar un trastorno ocular en un ser humano seleccionado del grupo que consiste en degeneración retiniana autosómica recesiva grave de inicio temprano (amaurosis congénita de Leber), acromatopsia congénita, enfermedad de Stargardt, enfermedad de Best, enfermedad de Doyne, distrofia de conos, retinitis pigmentosa, retinosquisis ligada al cromosoma X, síndrome de Usher, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración macular atrófica relacionada con la edad, AMD neovascular, maculopatía diabética, retinopatía diabética proliferativa (PDR), edema macular cistoide, retinopatía serosa central, desprendimiento de retina, inflamación intraocular, glaucoma y uveítis posterior.
6. La partícula de rAAV para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3-4, o la composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en donde la una o más sustituciones de aminoácidos reducen la unión de la partícula de rAAV al proteoglicano de heparán sulfato en aproximadamente al menos un 10%, aproximadamente al menos un 25%, aproximadamente al menos un 50%, aproximadamente al menos un 75% o aproximadamente al menos el 100%.
7. La partícula de rAAV para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-4 y 6, o la composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en donde la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden la sustitución de un residuo de arginina o lisina con un residuo de alanina.
8. La partícula de rAAV para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-4 y 6-7, o la composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-7, en donde la una o más sustituciones de aminoácidos comprenden sustituciones en las posiciones R484 y R487 o en las posiciones R585 y R588, numeración basada en VP1 de AAV2.
9. La partícula de rAAV para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-4 y 6-8, o la composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en donde las proteínas de la cápside de AAV2 comprenden sustituciones de aminoácidos R585A y R588A, numeración basada en VP1 de AAV2.
10. La partícula de rAAV para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-4 y 6-9, o la composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-9, en donde las proteínas de la cápside de AAV2 comprenden la sustitución de aminoácidos K532A, numeración basada en VP1 de AAV2.
11. La partícula de rAAV para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-4 y 6-10, o la composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-10, en donde la partícula de rAAV comprende una

o más proteínas de la cápside de AAV2 que tienen al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% o 100% de identidad de secuencia con SEC ID NOs: .2, 4 o 6.

5 12. La partícula de rAAV para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-4 y 6-11, o la composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-11, en donde el ácido nucleico heterólogos codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un antioxidante, un factor neurotrófico, un factor antiapoptótico, 10 un factor anti-angiogénico y un factor antiinflamatorio.

10 13. La partícula de rAAV para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-4 y 6-11, o la composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-11, en donde el ácido nucleico heterólogos codifica un ácido nucleico terapéutico.

15 14. La partícula de rAAV para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-4 y 6-13, o la composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-13, en donde el vector rAAV es un vector rAAV auto-complementario.

Aminoácido de AAV2 nº	484	487	532	535	588
AAV2	R	R	K	R	R
AAV2 HBK0	R	R	K	A	A

FIG. 1

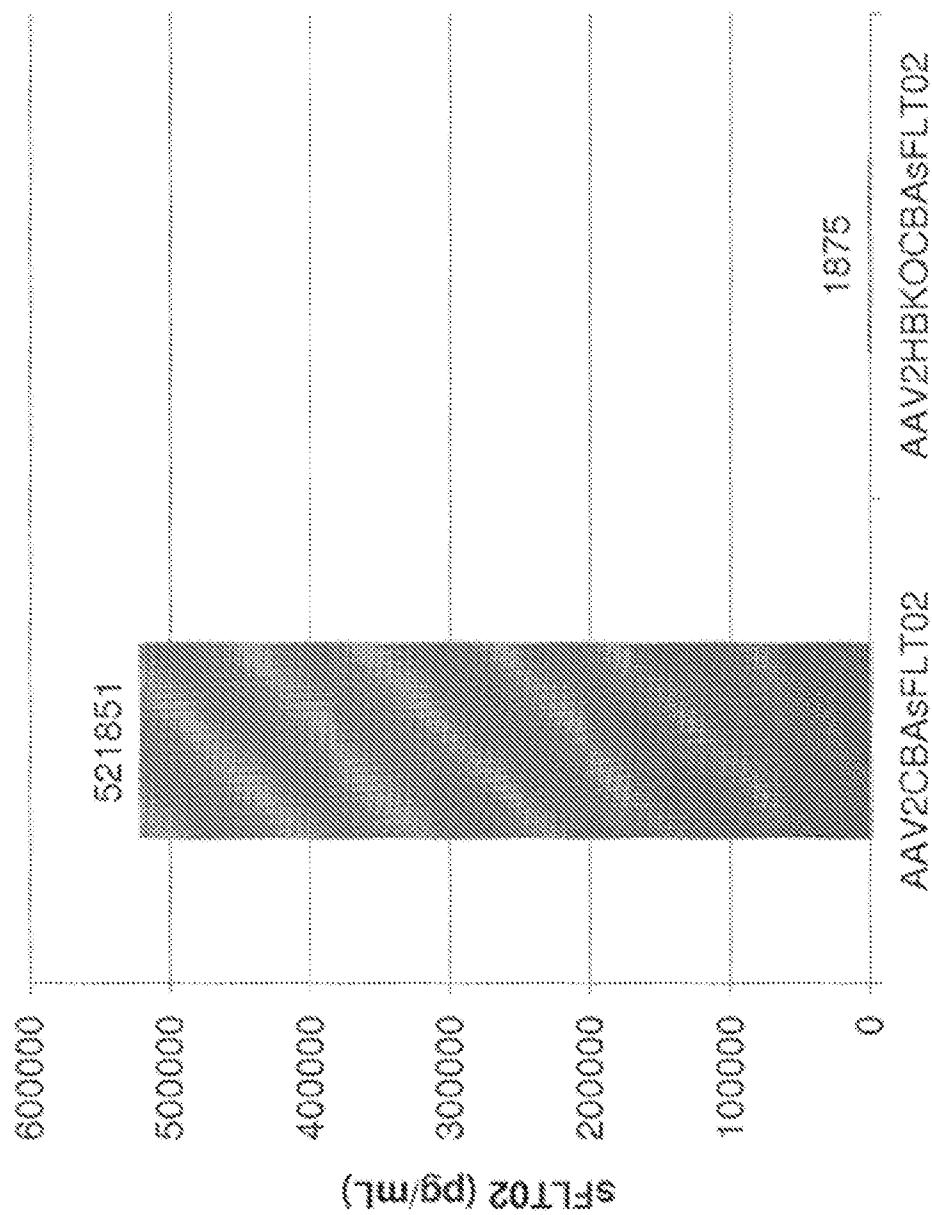
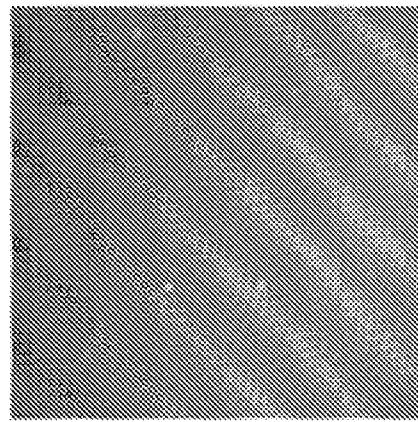
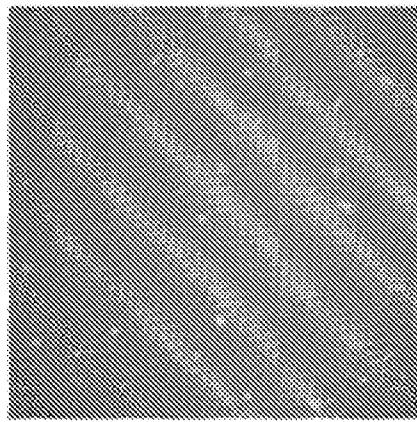
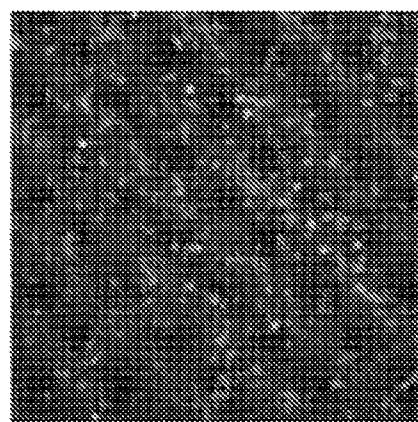
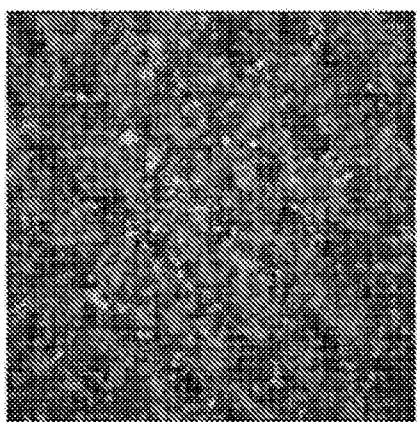


FIG. 2

AAV2 HBK0 CBA-GFP



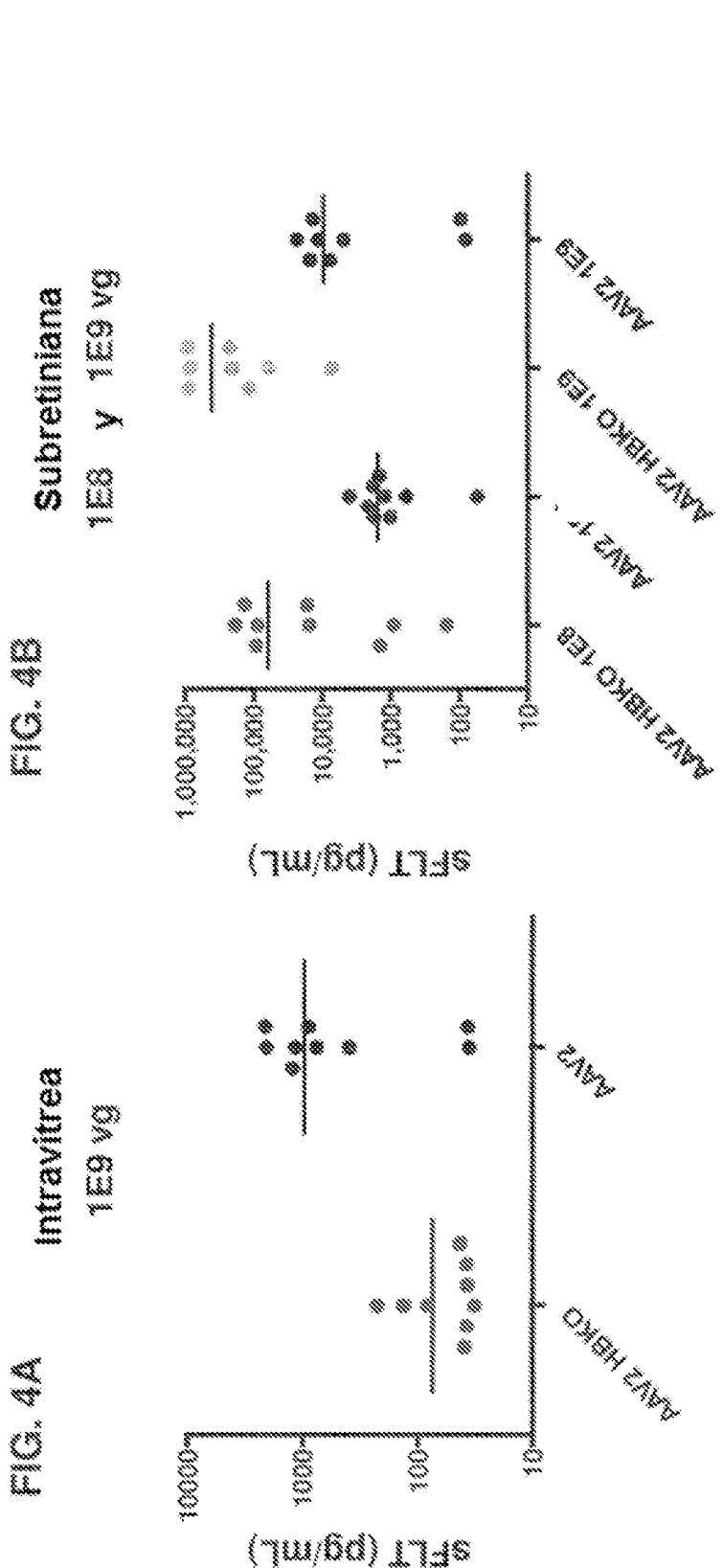
AAV2 CBA-GFP



células
293

células
HeLa

FIG. 3



FIGS. 4A y 4B

Mutaciones de arginina disminuyen la transducción
intravítreas de AAV2 en el ojo de ratón

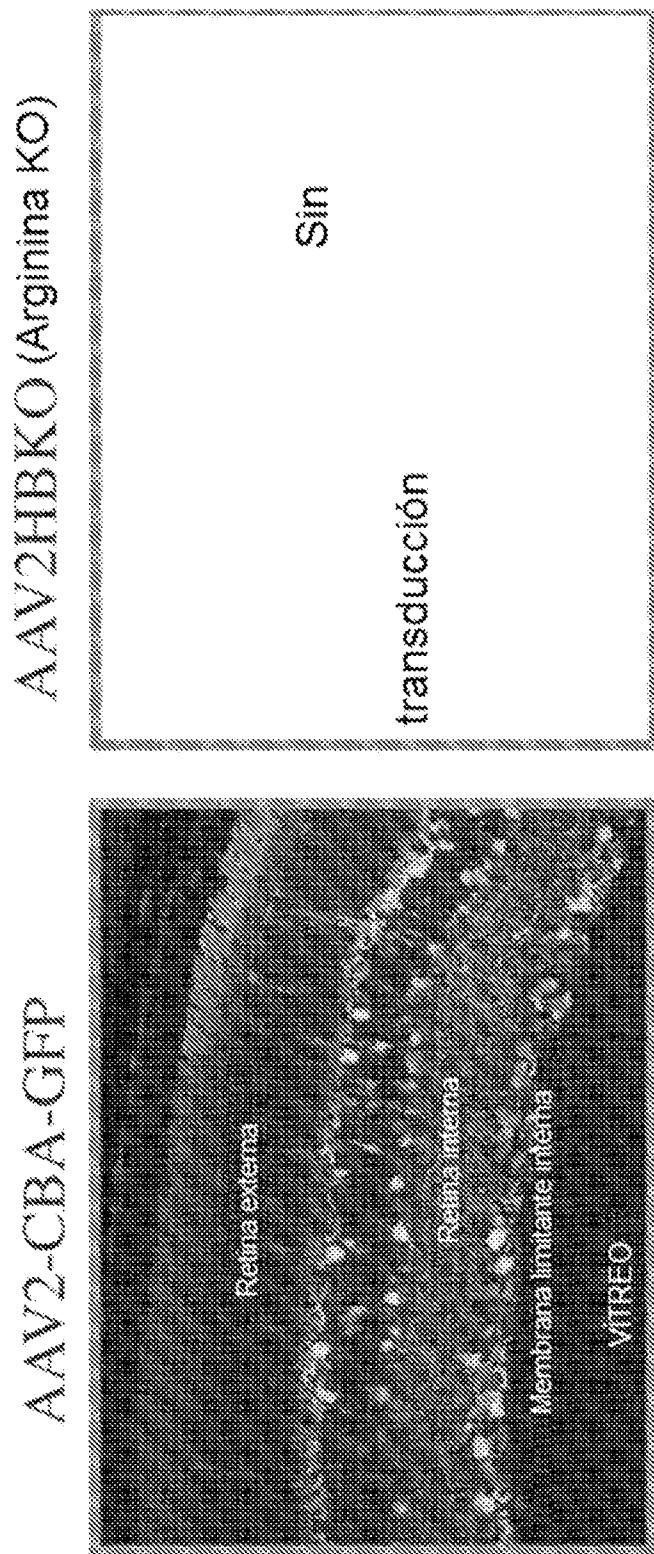


FIG. 5

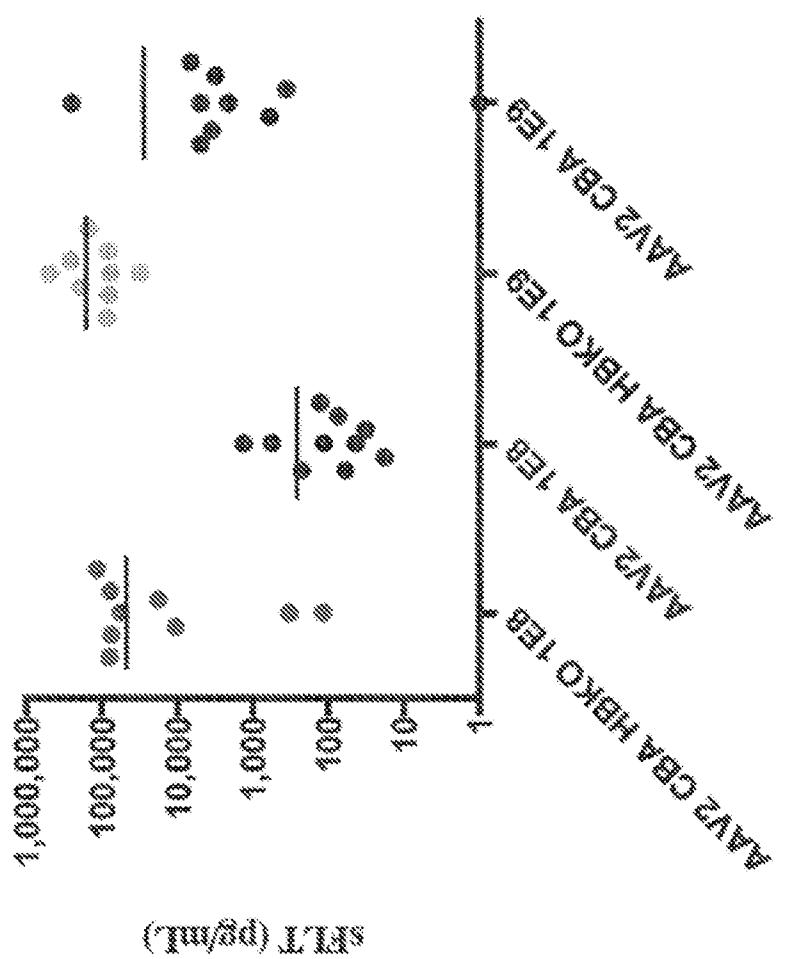


FIG. 6

AAV2-CBA-GFP

AAV2HBKO-CBA-GFP

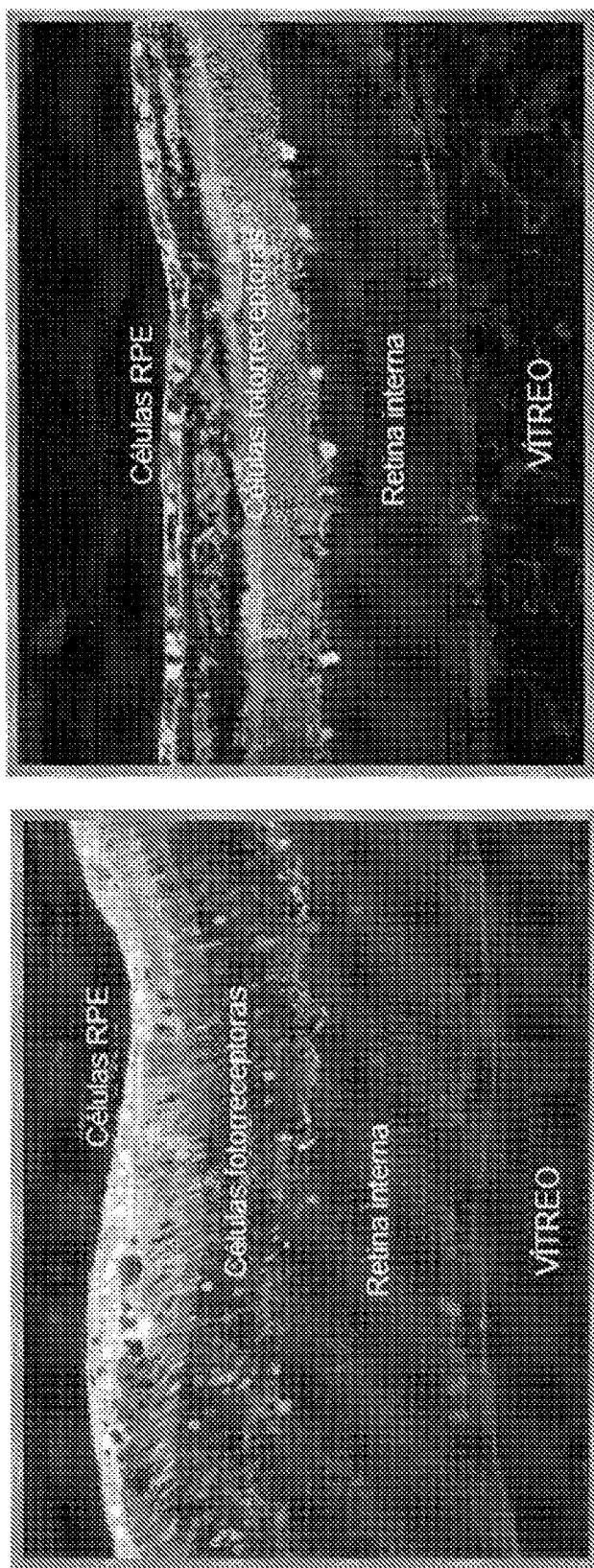


FIG. 7

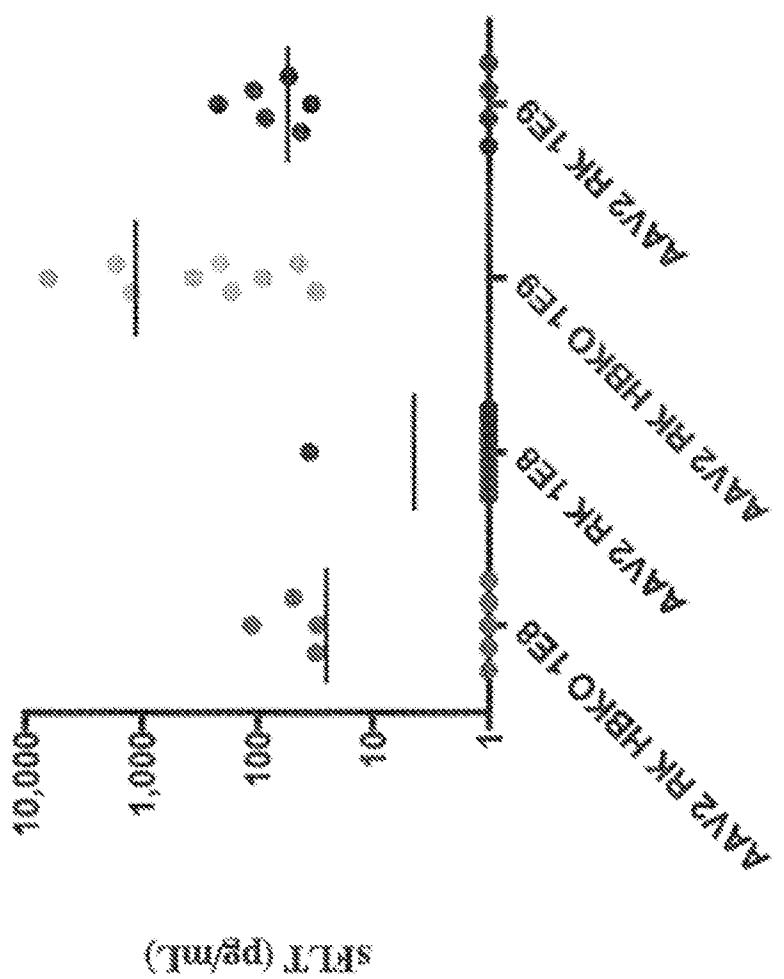


FIG. 8

FIG. 9A

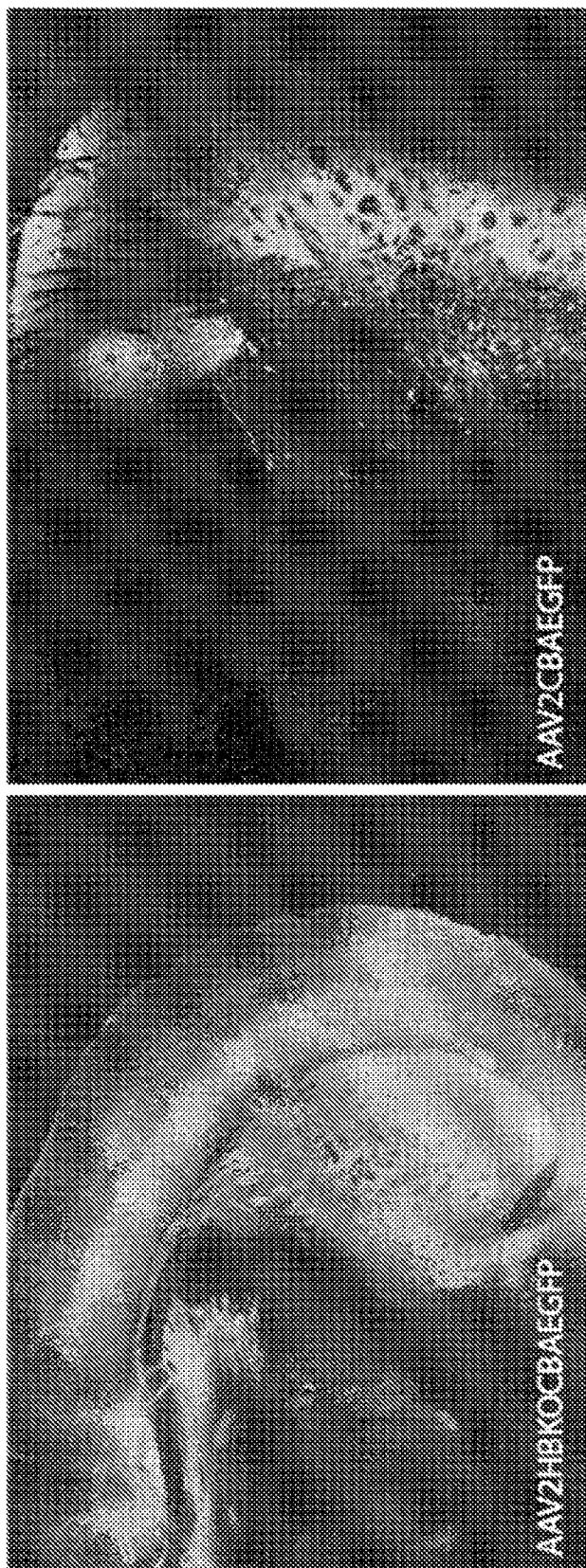
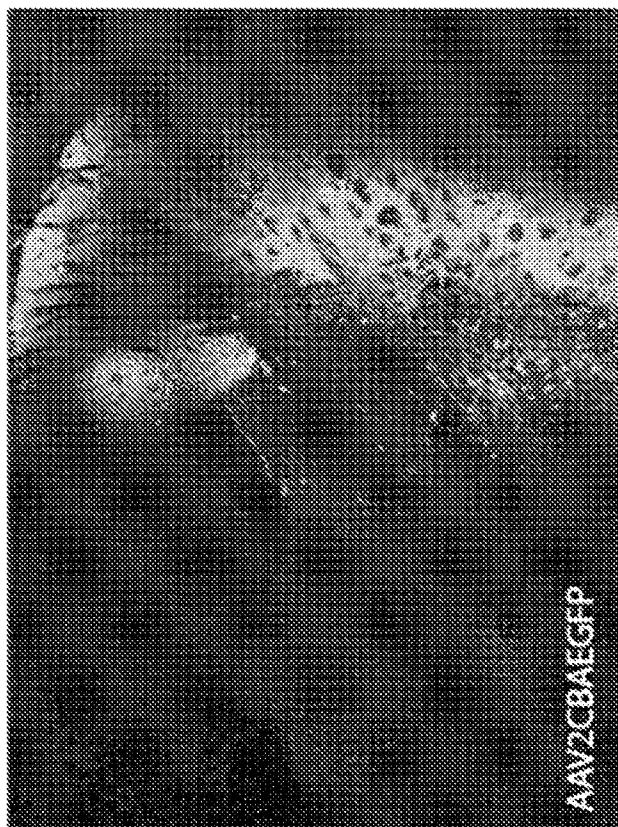


FIG. 9B



FIGS. 9A & 9B

20X
10X
4X

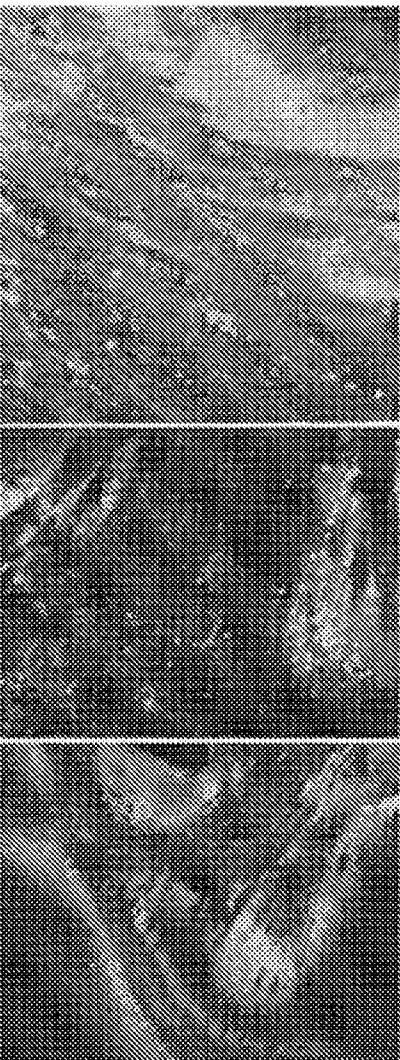
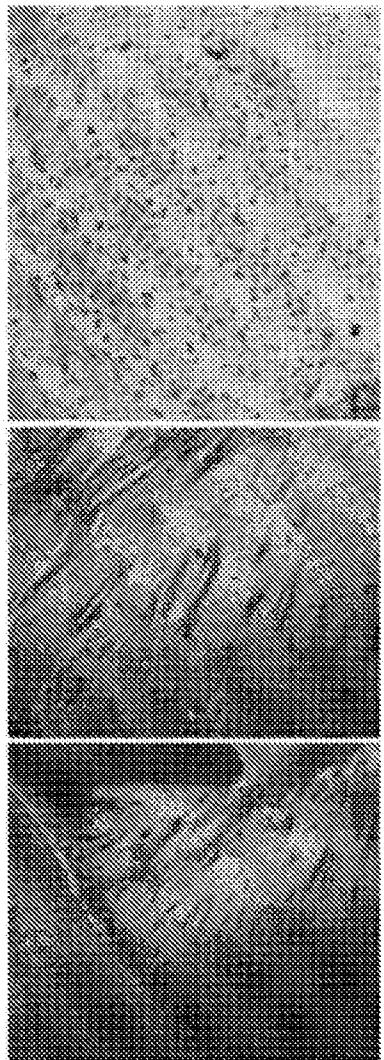


FIG. 10A

HAZ

FIG. 10B

HAZ3H8KO



FIGS. 10A y 10B

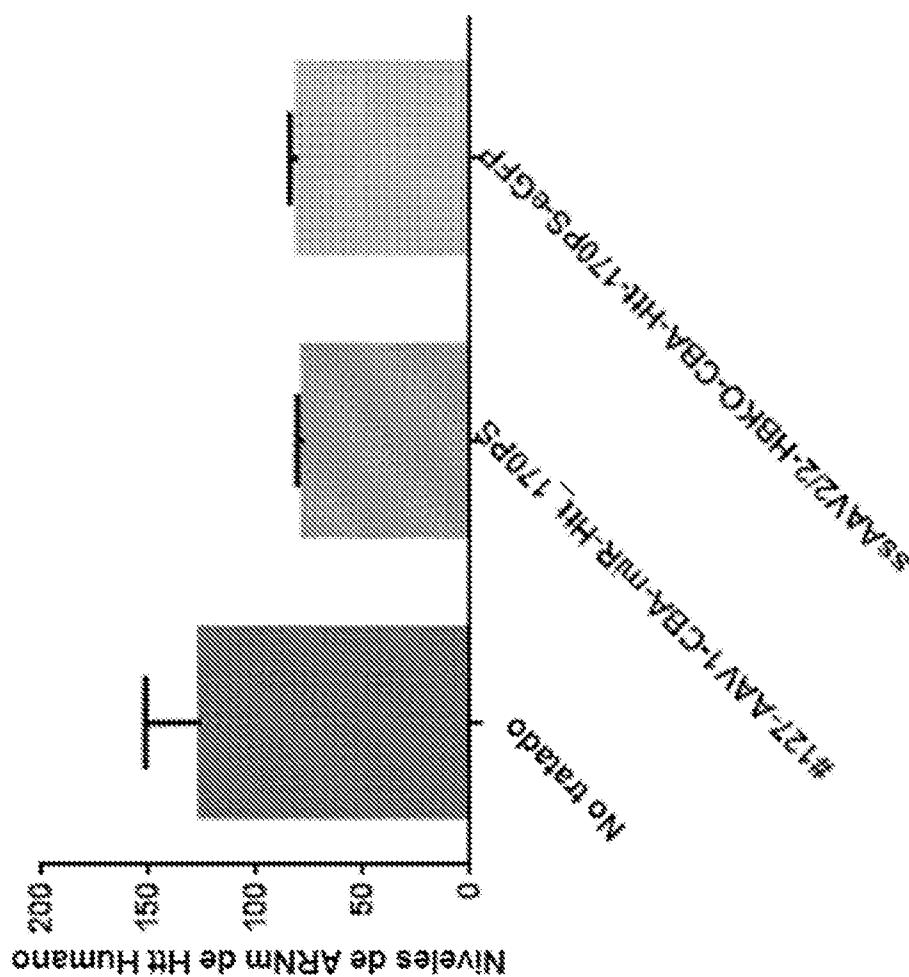


FIG. 11A

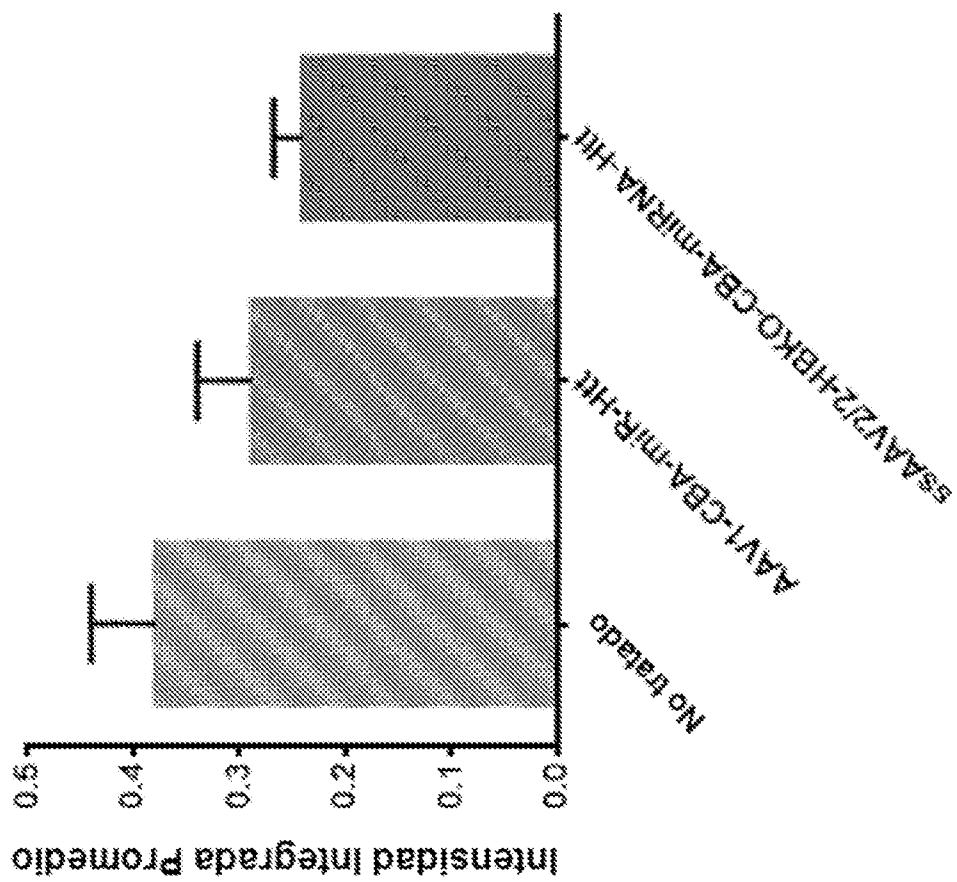
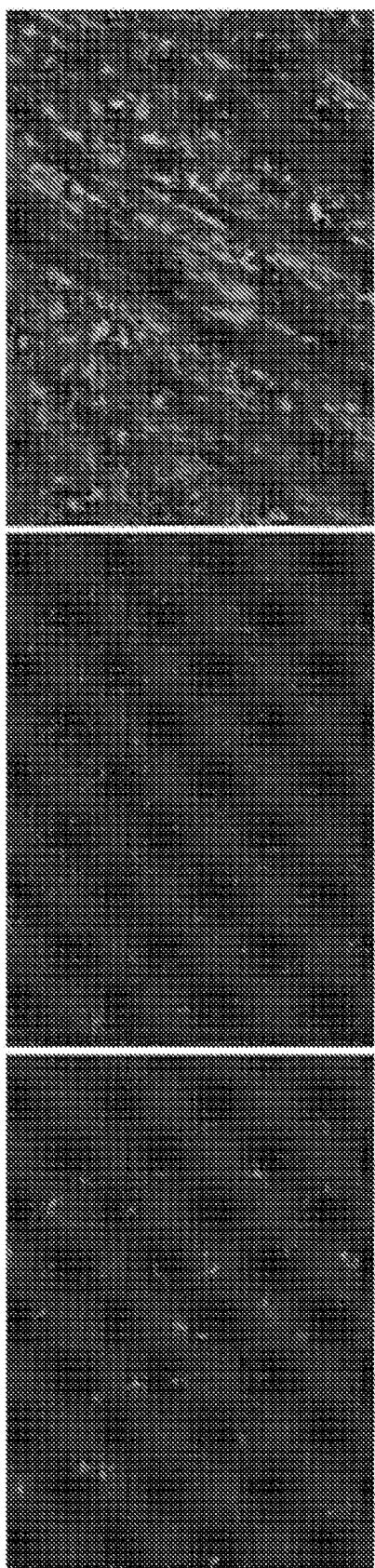


FIG. 11B

FIG. 12A

FIG. 12B

FIG. 12C



FIGS. 12A-12C

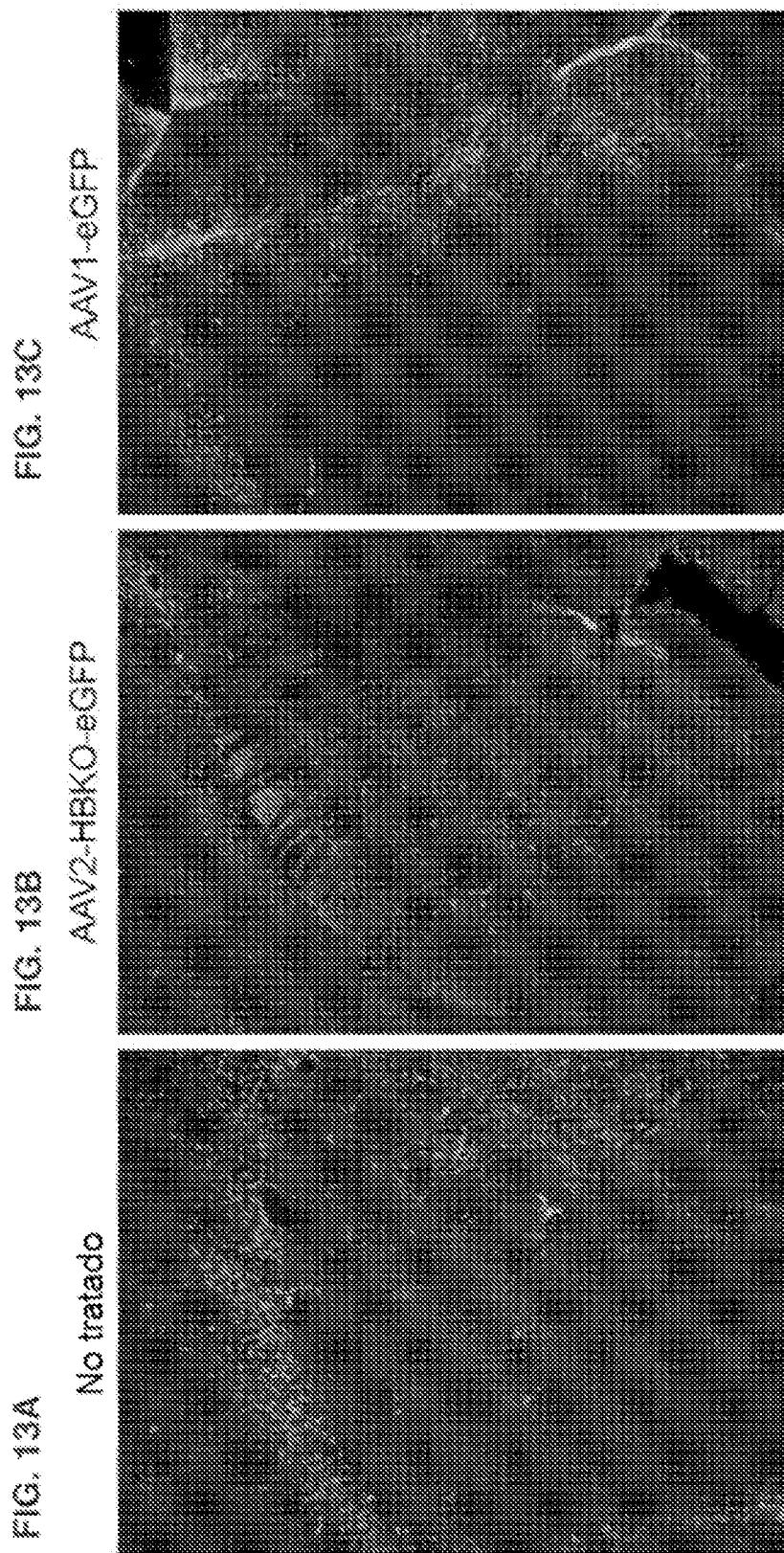


FIG. 13A

FIG. 13B

FIG. 13C
AAV2-HBcKO-eGFP

FIG. 13C

FIGS. 13A-13C

Aminoácido de AAV2 n°	484	487	532	585	588
AAV2	R	R	K	R	R
AAVm8R	R	R	R	A	T
Aminoácido de AAVm8R n°	485	488	533	586	589

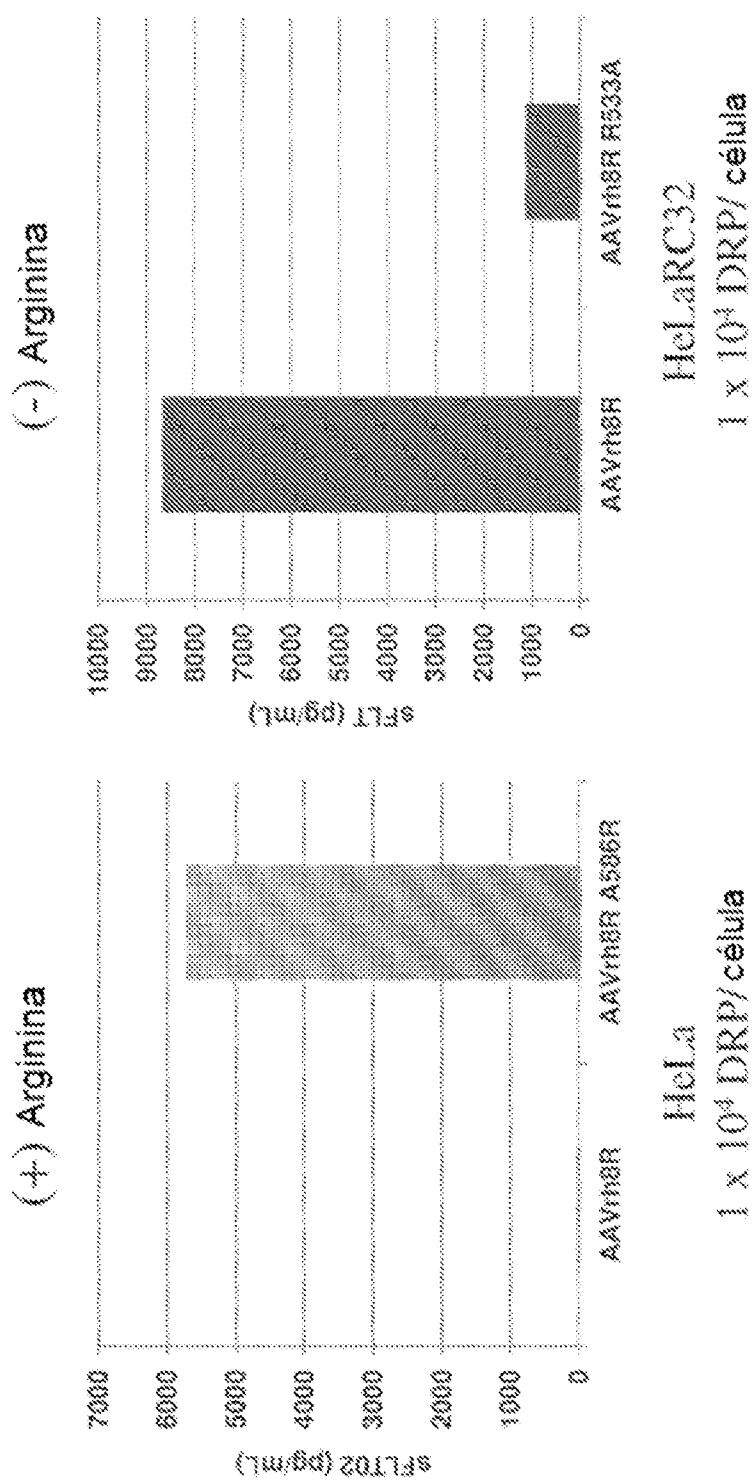
FIG. 14

Aminoácido de AAV2 n°	484	487	532	585	588
AAV2	R	R	K	R	R
AAVrh8R	R	R	R	A	T
AAVrh8R A586R	R	R	R	(R)	T
AAVrh8R R533A	R	R	R	(A)	A
Aminoácido de AAVrh8R n°	485	488	533	586	589

FIG. 15

FIG. 16A

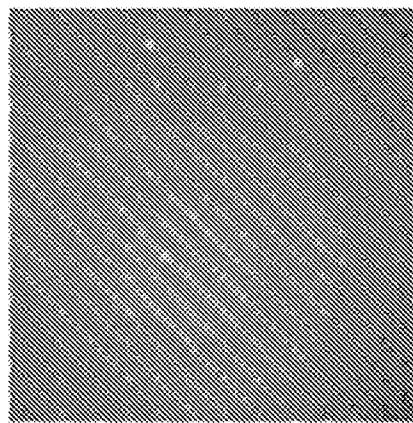
FIG. 16B



FIGS. 16A Y 16B

FIG. 17A
AAVrh8R

AAVrh8R AS86R



células NS1
IES DKK/célula
(+) Adsl 149

FIG. 17B

(+) Adsl

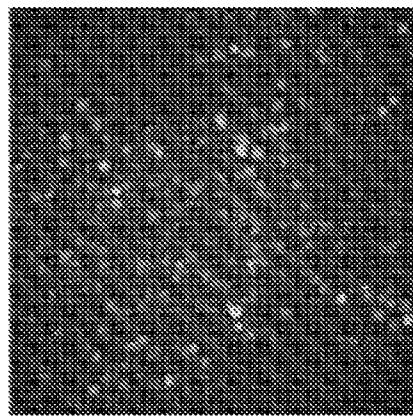
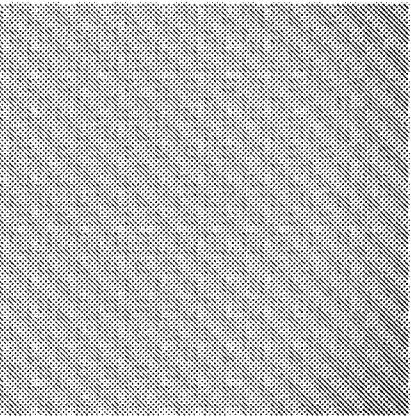


FIG. 17C

células HeLa
IES DKK/célula
(+) Adsl 149

FIG. 17D

(-) Adsl



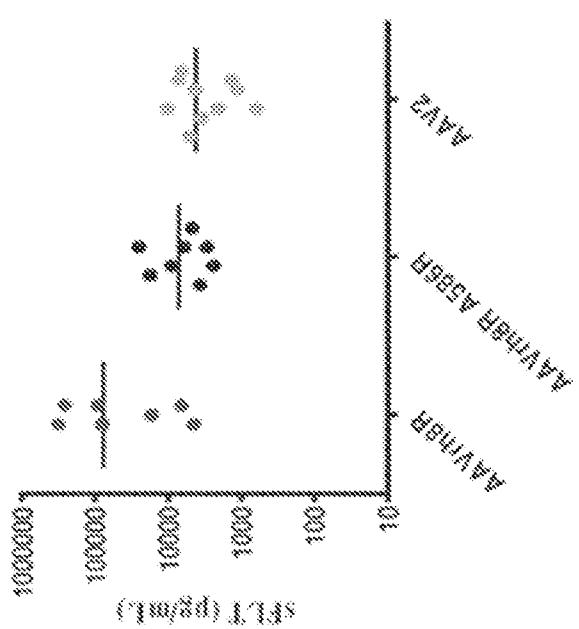
AAVrh8R

AAVrh8R AS86R

FIGS. 17A-17D

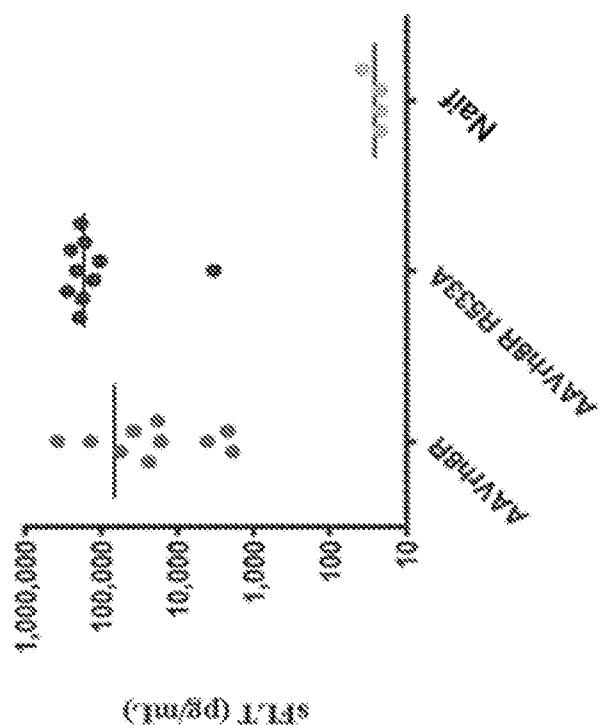
ES 2 879 636 T5

FIG. 18A



FIGS. 18A & 18B

FIG. 18B



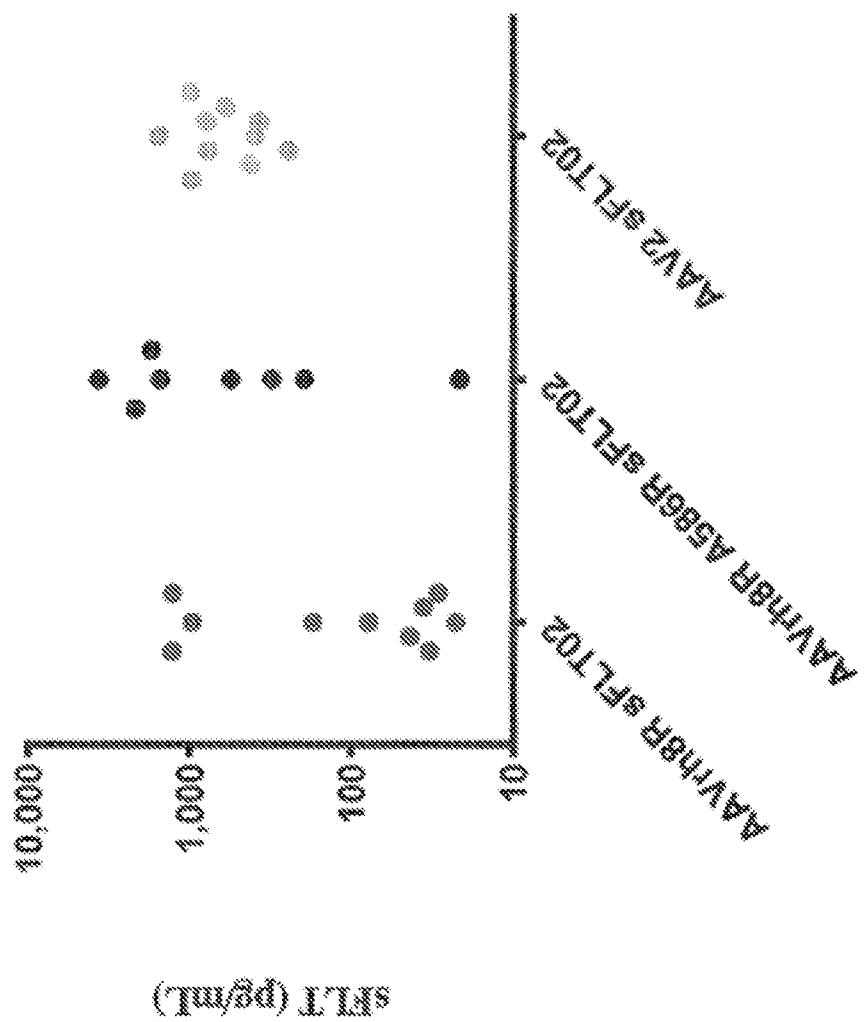


FIG. 19

Aminoácido de AAV nº AAV2	484 R	487 R	527 K	532 K	545 R	588 R
Aminoácido de AAV nº AAV1	485 R	488 R	528 K	533 K	546 S	589 T
AAV6	R	R	K	K	S	T
AAV9	R	R	K	K	S	A
AAVrh8R	R	R	K	R	A	T
Aminoácido de AAV nº AAV8	487 R	490 R	525 K	535 R	549 Q	587 T
AAVrh10	R	R	K	R	Q	A

FIG. 20