

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 054**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/90** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.03.2016 PCT/US2016/021226**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.09.2016 WO16144892**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2016 E 16762307 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3265568**

54 Título: **Terapias de aumento génico de la degeneración retiniana causada por mutaciones en el gen PRPF31**

30 Prioridad:

**06.03.2015 US 201562129638 P**

**14.04.2015 US 201562147307 P**

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

**16.02.2021**

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS EYE & EAR INFIRMARY  
(100.0%)**

**243 Charles Street  
Boston, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

**PIERCE, ERIC A.;  
FARKAS, MICHAEL H. y  
SOUSA, MARIA E.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 806 054 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Terapias de aumento génico de la degeneración retiniana causada por mutaciones en el gen PRPF31

5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere a los métodos y composiciones para la terapia génica de la retinitis pigmentosa relacionada con mutaciones en el factor de procesamiento 31 del pre-ARNm (PRPF31).

10 Antecedentes

Las mutaciones en el factor de procesamiento 31 del pre-ARNm (PRPF31) provocan retinitis pigmentosa (RP) no sindrómica en humanos, una distrofia hereditaria de retina (IRD). Actualmente no está claro qué mecanismos, o qué tejidos, se ven afectados en presencia de mutaciones en estas proteínas expresadas de forma ubicua.

15 Resúmen

La invención se define en las reivindicaciones. En el presente documento se describen los métodos y composiciones para la terapia génica de la retinitis pigmentosa relacionada con mutaciones en el factor de procesamiento 31 del pre-ARNm (PRPF31).

20 Así, se proporcionan en el presente documento vectores y composiciones para el uso en el tratamiento de la retinitis pigmentosa provocada por mutaciones en el PRPF31 en un sujeto humano, o para aumentar la expresión de PRPF31 en el ojo de un sujeto humano. Los métodos, que forman parte de la presente divulgación, incluyen la administración en el ojo del sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un vector viral adeno-asociado, por ejemplo, un vector de virus adeno-asociado de tipo 2 (AAV2), que comprende una secuencia que codifica el PRPF31 humano, operativamente enlazado a un promotor que dirige la expresión en células del epitelio pigmentario de la retina (RPE).

25 El promotor puede ser específico de RPE o puede ser un promotor general que dirige también la expresión en otros tipos celulares, por ejemplo, CASI o CAG. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de RPE65 o VMD2.

30 En algunas realizaciones, la secuencia de PRPF31 está optimizada por codones, por ejemplo, para la expresión en células humanas donde el sujeto es un humano. En algunas realizaciones, la secuencia de PRPF31 es o comprende, o codifica la misma proteína que, nts 1319-2818 de la SEQ ID NO:34.

35 En algunos aspectos de la divulgación, el vector se administra mediante inyección subretiniana.

En algunos aspectos de la divulgación, el vector comprende, o comprende una secuencia que codifica, un polipéptido de cápside de AAV descrito en el documento WO 2015054653.

40 En el presente documento también se proporcionan vectores virales adeno-asociados, por ejemplo, vectores de virus adeno-asociados de tipo 2 (AAV2) que comprenden una secuencia que codifica PRPF31 humano, operativamente enlazado a un promotor que dirige la expresión en células del epitelio pigmentario de la retina (RPE). El promotor puede ser específico de RPE o puede ser un promotor general que dirige también la expresión en otros tipos celulares, por ejemplo, CASI o CAG. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de RPE65 o VMD2. En algunas realizaciones, la secuencia de PRPF31 está optimizada por codones, por ejemplo, para la expresión en células humanas. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el vector, preferentemente formuladas para la administración vía inyección subretiniana.

45 También se prevé aquí el uso de ácidos nucleicos, los vectores y las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que comúnmente comprende un experto en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Se describen los métodos y materiales para el uso en la presente invención; también pueden utilizarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser restrictivos. En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluyendo las definiciones.

50 Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las figuras, así como a partir de las reivindicaciones.

60 Descripción de las figuras

Figuras 1A-F. Inhibición de fagocitosis en ratones mutantes de Prpf. Se establecieron cultivos primarios de epitelio pigmentario de la retina (RPE) de ratones mutantes de Prpf de 9-10 días de edad y controles de sus camadas, después se expusieron con segmentos externos de fotorreceptores porcinos marcados con FITC y núcleos marcados con DAPI (azul). (A) Representación cualitativa de células de RPE primarias (tinción de DAPI azul de núcleos) de tipo salvaje

(WT) o ratones mutantes (MUT) de Prpf3T494M/T494M, Prpf8H2309P/H2309P, Prpf31+/- . Se observó una diferencia en la captación de POS entre los mutantes y los controles. (B) El análisis cuantitativo de la ratio fagocítica demuestra una disminución significativa en la fagocitosis en los ratones mutantes (MUT) en comparación con la camada de tipo salvaje (WT) para las 3 cepas de ratón mutante tal como se indica (\* P < 0.05, N = 3-5). (B) Se compararon las relaciones de unión e internalización de POS entre ratones de Prpf31+/- (MUT) comparados con controles de tipo salvaje (WT) mostrando una disminución significativa en la unión (Bind.), pero ningún cambio significativo en la internalización (Intern.) de POS en ratones mutantes (\* P < 0.05, N = 2-5). (D) Una línea estable de atenuación mediada por ARNsh de PRPF31 en células ARPE-19. También se observó una diferencia en la captación de POS entre las células ARPE-19 transfectadas con ARNsh de control y las células ARPE-19 transfectadas con ARNsh de anti-PRPF31. (E) El ensayo de viabilidad celular para determinar el efecto de la atenuación de PRPF31 en células ARPE-19 muestra que no hay diferencias significativas en el crecimiento o viabilidad celular después de la atenuación de ARNsh de PRPF31 con respecto al control no focalizado (P > 0,05, N = 6). (F) La atenuación mediada por ARNsh de PRPF31 en la línea celular ARPE-19 humana también inhibe la fagocitosis significativamente tal como se muestra por el número disminuido de POS por célula en comparación con construcciones no focalizadas (NTC) (\* P < 0,05, N = 3). Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

Figuras 2A-C. La ritmicidad diurna de la fagocitosis en ratones mutantes de Prpf se ve alterada. Se sometió a ensayo la fagocitosis *in vivo* a las 2 horas antes de la aparición de luz (-2), a la aparición de luz (0) y 2, 4 y 6 (+2, +4, +6) horas después de la aparición de luz. (A, B) Se muestran imágenes representativas a las +2 (pico fagocítico) y +8 (fuera del pico fagocítico) horas después de la aparición de luz tal como se indica. RPE: epitelio pigmentario de la retina, OS: segmentos externos de fotorreceptores, Ch: coroides. (A) Se realizó la detección de fagosomas tempranos en ratones mutantes de Prpf3 y Prpf8 utilizando microscopía de electrones y recuento de fagosomas que se encontraban 1) en el citoplasma del RPE y 2) contenidos en la estructura lamelar visible (puntas de flecha negras) Barra de escala de 2 mm. (B) Se determinó el ritmo diurno de los ratones Prpf31+/- utilizando tinción inmunofluorescente por rodopsina (Ig-AlexaFluor488) y la detección de fagosomas (puntas de flecha blancas) localizados en la capa celular del RPE (núcleos con tinción DAPI) por la totalidad de 100 mm de retina intacta. Barra de escala de 20 mm. (C) La cuantificación de fagosomas por todos los puntos de tiempo demuestra la significativa alteración uniforme del estallido fagocítico en todos los ratones mutantes de Prpf (\* P < 0,05, N = 2 para mutantes de Prpf3 y Prpf8 y N = 3-5 para ratones mutantes de Prpf31). Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

Figuras 3A-B. Alteraciones en adhesión retiniana en ratones mutantes de Prpf en el punto de tiempo pico. Se determinó la resistencia adhesiva entre microvellosidades apicales de RPE y POS cuantificando la cantidad de pigmentos o proteínas de RPE que se adhieren a la retina neural, con respecto al control de WT. (A) La cuantificación de melanina demuestra que disminuye la adhesión en los tres ratones mutantes en el punto de tiempo pico 3,5 horas después de la aparición de luz y en ratones Prpf8H2309P/H2309P en el punto de tiempo fuera del pico (\* P < 0,05, N = 3-7). (B) Las mediciones cuantitativas de proteínas RPE65 en inmunotransferencias confirman los hallazgos de melanina en los tres ratones mutantes en el punto de tiempo pico, sin embargo, solo se observa una tendencia de disminución en la adhesión en los puntos fuera del pico en ratones mutantes de Prpf8 (\* P < 0,05, N = 4-7). Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

Figuras 4A-C. La localización y expresión de algunos marcadores de adhesión y fagocitosis se ven alterados en ratones mutantes de Prpf3 y Prpf8 Imágenes representativas de la expresión y localización de (A) subunidades de receptores de las integrinas  $\alpha v$  y  $\beta 5$  y ligando Mfg-E8 asociado, (B) proteína de señalización intracelular FAK y (C) receptores merTK y ligandos de Gas6 y Proteína S asociados en criosecciones retinianas de control de tipo salvaje (WT) así como mutantes de Prpf3 y Prpf8 tal como se indica. Las imágenes de las secciones sometidas a ensayo con IgG (IgG) no inmunológica se incluyen para cada antígeno. RPE: epitelio pigmentario de la retina, OS: segmentos externos de fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa. Se observó la localización de integrina  $\beta 5$  en el lado basal del RPE tanto ratones mutantes de Prpf3 como de Prpf8. Además, no se localizó correctamente FAK en ratones mutantes de Prpf8 en el lado basal del RPE. Cada proteína de interés se tiñó con IgG-AlexaFluor488 y los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra de escala de 40 mm.

Figuras 5A-C. La localización y expresión de algunos marcadores de adhesión y fagocitosis se ven alterados en ratones mutantes de Prpf31. Imágenes representativas de la expresión y localización de (A) subunidades de receptores de las integrinas  $\alpha v$  y  $\beta 5$  y ligando Mfg-E8 asociado, (B) proteína de señalización intracelular FAK y (C) receptores merTK y ligandos de Gas6 y Proteína S asociados o IgG (IgG) no inmunológica en secciones de parafina retiniana de control de tipo salvaje (WT) así como de mutante de Prpf31 como se indica. RPE: epitelio pigmentario de la retina, OS: segmentos externos de fotorreceptores, ONL: capa nuclear externa. El cambio más notable en ratones mutantes de Prpf31 es la incorrecta localización de integrina  $\beta 5$  en el lado basal del RPE, mientras que la localización de MerTK también se ve alterada. Cada proteína de interés se tiñó con IgG-AlexaFluor488 y los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra de escala de 20 mm.

Figura 6. Secuencia de líneas celulares hiPSC de PRPF31+/- y ARPE-19 generadas por edición genómica. El modelo génico para PRPF31 se muestra anteriormente, con detalle de secuencia en los exones 6-7 para las tres líneas celulares de ejemplo que se muestran a continuación. La línea celular hiPSC desactivada tiene una supresión de 4pb heterocigótica (las bases suprimidas se muestran con superlíneas en la secuencia normal), lo cual da como resultado el desplazamiento del marco de lectura (aminoácidos subrayados) Las líneas celulares ARPE-19 desactivadas

representadas tienen una supresión de 4pb o una sola inserción de base lo cual también da como resultado desplazamientos del marco y alelos nulos.

Figura 7. Captación de POS relativa después del tratamiento con AAV.CASI.PRPF31. Se transdujeron células ARPE-19 de PRPF 31 con genoma editado (GE31) con AAV.CASI.PRPF31 en MOI de 0, 10.000 y 15.000 durante 3 días. Posteriormente, se incubaron las células con FITC-POS durante 1 hora y se sometieron a recuento las células positivas de FITC mediante citometría de flujo. \*P<0,05.

Descripción detallada

La invención se define en las reivindicaciones. Las mutaciones en genes que codifican factores de ajuste de ARN son la segunda causa más común de la forma dominante del trastorno de ceguera de la retinitis pigmentosa (RP) y, de este modo, son una causa importante de pérdida de visión (Hartong et al., *Lancet*. 2006;368:1795-809; Daiger et al., *Archives Ophthalmology*. 2007;125:151-8; Sullivan et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013;54:6255-61. PMID: 3778873). Los factores de ajuste afectados, factor de procesamiento de pre-ARNm (PRPF) 3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31 y SNRNP200 son componentes altamente conservados del ayustosoma, el complejo que escinde intrones de transcripciones de ARN nacientes para generar ARNm maduros (McKie et al., *Human Molecular Genetics*. 2001;10:1555-62; Vithana et al., *Molecular Cell*. 2001;8:375-81; Chakarova et al., *Human Molecular Genetics*. 2002;11:87-92; Keen et al., *European Journal Human Genetics*. 2002;10:245-9; Nilsen, *Bioessays*. 2003;25:1147-9; Sullivan et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006;47:4579-88; Zhao et al., *American Journal Human Genetics*. 2009;85:617-27; Tanackovic et al., *American Journal Human Genetics*. 2011;88:643-9; Chen et al., *Human Molecular Genetics*. 2014;23:2926-39.). Las mutaciones en el gen de PRPF31 son la causa más común de factor de ajuste de ARN de RP, y se estima en 2.400 a 8.500 individuos afectados en los EE.UU. y de 55.000 a 193.000 personas en todo el mundo (Daiger et al., *Archives Ophthalmology*. 2007;125:151-8; Sullivan et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013;54:6255-61. PMID: 3778873). Puesto que el ajuste de ARN se requiere en todas las células, no queda claro cómo las mutaciones en estas proteínas ubicuas llevan a la enfermedad específica de la retina.

Para comprender el mecanismo(s) mediante el cual cuales las mutaciones en los factores de ajuste de ARN provocan degeneración retiniana, se estudiaron los fenotipos de ratones mutantes de Prpf3, Prpf8 y Prpf31. Se identificaron defectos autónomos de células en la función celular del epitelio pigmentario de la retina (RPE) en ratones focalizados en genes; sin embargo, las diferencias génicas y fenotípicas en la enfermedad entre los modelos de ratón y la afección humana hace que las conclusiones extraídas en ratones dificulten potencialmente traducirlo a los humanos.

Hay pruebas de que las mutaciones en el PRPF31 causan la enfermedad por medio de haploinsuficiencia y, por tanto, que esta forma de RP dominante es susceptible de tratamiento con terapia de aumento génico. Muchas de las mutaciones identificadas en PRPF31 son o bien grandes supresiones cromosómicas o son mutaciones sin sentido y desplazamiento del marco de lectura que llevan a codones de terminación prematuros que experimentan la desintegración de ARNm mediado por sin sentido y dan como resultado alelos nulos (Vithana et al., *Molecular Cell*. 2001;8:375-81; Sullivan et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006;47:4579-88.; Wang et al., *American Journal Medical Genetics A*. 2003;121A:235-9; Xia et al., *Molecular Vision*. 2004;10:361-5; Sato et al., *American Journal Ophthalmology*. 2005;140:537-40; Abu-Safieh et al., *MolVis*. 2006;12:384-8; Rivolta et al., *Human Mutation*. 2006;27:644-53; Waseem et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2007;48:1330-4; Rio Frio et al., *Human Mutation*. 2009;30:1340-7. PMID: 2753193; Rose et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52:6597-603; Saini et al., *Experimental Eye Research*. 2012;104:82-8). De este modo, se piensa que la degeneración retiniana asociada a PRPF31 está provocada por haploinsuficiencia. Acorde con esta hipótesis, el nivel de expresión de PRPF31 del alelo de tipo salvaje se corresponde con la gravedad de la enfermedad en pacientes con mutaciones en el PRPF31 (Rio et al., *Journal Clinical Investigation*. 2008;118:1519-31; Vithana et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003;44:4204-9; McGee et al., *American Journal Human Genetics*. 1997;61:1059-66). Se ha informado de dos mecanismos para contribuir a la regulación de la expresión del alelo de PRPF31 de tipo salvaje. Primero, CNOT3 regula la expresión de PRPF31 vía represión transcripcional; en portadores asintomáticos de mutaciones de PRPF31, CNOT3 se expresa a bajos niveles, permitiendo producir cantidades mayores de transcripciones de PRPF31 de tipo salvaje y evitando la manifestación de degeneración retiniana (Venturini et al., *PLoS genetics*. 2012;8:e1003040. PMID: 3493449; Rose et al., *Annals Human Genetics*. 2013). En segundo lugar, MSR1 se ha identificado como un elemento regulador de cis en sentido ascendente del PRPF31. De este modo, la variación genética ha demostrado que el aumento de la expresión genética de PRPF31 puede reducir o eliminar la pérdida de visión en este trastorno.

Tal como se describe aquí, los presentes inventores han identificado las células de RPE como las células primarias afectadas en el factor de ajuste de ARN de RP; esto genera una oportunidad para avanzar en el desarrollo de la terapia de aumento génico para enfermedades causadas por mutaciones en el PRPF31 (ver Ejemplo 1). Para conseguir este objetivo, aquí se describen vectores de AAV para expresar PRPF31 humano, que pueden utilizarse para mejorar el fenotipo en sujetos humanos.

La secuencia de PRPF31 humano, también conocida como ribonucleoproteína pequeña nuclear U4/U6 de Prp31, está disponible en el GenBank con los N.º de acceso NM\_015629.3 (ácido nucleico) y NP\_056444.3 (Proteína). Los sujetos

que tienen RP asociada con mutaciones en el PRPF31 pueden ser identificados mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por secuenciación del gen de PRPF31 (NG\_009759.1, Rango: 5001 a 21361) o NC\_000019.10 Referencia GRCh38.p2 Conjunto Primario, Rango 54115376 a 54131719). Se ha identificado una gran cantidad de mutaciones en individuos afectados; ver, por ejemplo, Villanueva et al. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014; Dong et al. Mol Vis, 2013; Lu F, et al. PLoS One, 2013; Utz et al. Ophthalmic Genet, 2013; and Xu F, et al. Mol Vis, 2012; Saini et al., Exp Eye Res. 2012 Nov;104:82-8; Rose et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Aug 22;52(9):6597-603; Audo et al., BMC Med Genet. 2010 Oct 12;11:145; and Tanackovic and Rivolta, Ophthalmic Genet. 2009 Jun;30(2):76-83.

De este modo, en el presente documento se describen vectores de expresión dirigidos para la transfección y expresión *in vivo* de un polinucleótido que codifica un polipéptido de PPF31 tal como se describe aquí, en células de RPE, por ejemplo, primariamente o solo en células de RPE. Las construcciones de expresiones de tales componentes pueden administrarse en cualquier vehículo efectivo, por ejemplo, cualquier formulación o composición capaz de suministrar eficazmente el gen del componente en células *in vivo*. Entre los enfoques se incluye la inserción del gen en vectores virales, incluyendo retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adeno-asociados, lentivirus y virus del herpes simple 1, alfavirus, virus, vacuna o plásmidos bacterianos recombinantes o eucariotas; los vectores virales preferentes son el virus adeno-asociado de tipo 2 (AAV2). Los vectores virales transfectan células directamente; se puede administrar ADN de plásmido desnudo o con la ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectamina) o derivatizado (por ejemplo, anticuerpo conjugado), dendrímeros catiónicos, vectores inorgánicos (por ejemplo, magnetofección de óxido de hierro), lipídeos, péptidos penetrantes celulares, polímeros de ciclodextrina (CDP), conjugados de polilisina, gramacidina S, envolturas virales artificiales u otros de tales como vehículos intracelulares, así como inyección directa de la construcción genética o precipitación con CaPO<sub>4</sub> realizada *in vivo*.

Un enfoque ejemplar para la introducción *in vivo* de ácido nucleico en una célula es mediante el uso de un vector viral que contiene ácido nucleico, por ejemplo, un ADNc. La infección de células con un vector viral tiene la ventaja de que una gran proporción de las células focalizadas puede recibir el ácido nucleico. Además, las moléculas codificadas dentro del vector viral, por ejemplo, por ADNc contenido en el vector viral, se expresan eficientemente en células que han recogido ácido nucleico del vector viral.

Los vectores virales pueden utilizarse como un sistema de suministro génico recombinante para la transferencia de genes exógenos *in vivo*, particularmente en seres humanos. Estos vectores proporcionan un suministro eficiente de genes en las células y, en algunos casos, los ácidos nucleicos transfectados se integran de forma estable en el ADN cromosómico del huésped. Los protocolos para producir virus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con tales virus pueden encontrarse en Ausubel, et al., eds., Gene Therapy Protocols Volume 1: Production and In Vivo Applications of Gene Transfer Vectors, Humana Press, (2008), págs. 1-32 y otros manuales de laboratorio estándar.

Un sistema de vector viral preferente útil para el suministro de ácidos nucleicos es el virus adeno-asociado (AAV). El virus adeno-asociado es un virus defectivo de origen natural que requiere otro virus, como un adenovirus o un virus del herpes, como virus asistente para su eficaz replicación y un ciclo de vida productivo. (Para una revisión, véase Muzyczka et al., Curr. Topics in Micro and Immunol. 158:97-129 (1992)). Los vectores de AAV transducen eficientemente diversos tipos de células y pueden producir la expresión a largo plazo de transgenes *in vivo*. Aunque los genomas de vector de AAV pueden persistir dentro de células como episomas, se ha observado la integración del vector (por ejemplo, Deyle and Russell, Curr Opin Mol Ther. agosto de 2009; 11(4): 442-447; Asokan et al., Mol Ther. abril de 2012; 20(4): 699-708; Flotte et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7:349-356 (1992); Samulski et al., J. Virol. 63:3822-3828 (1989); and McLaughlin et al., J. Virol. 62:1963-1973 (1989)). Los vectores de AAV, en particular, AAV2, se han utilizado ampliamente para el aumento o sustitución génica y han demostrado eficacia terapéutica en una serie de modelos animales, así como en la clínica; ver por ej., Mingozzi and High, Nature Reviews Genetics 12, 341-355 (2011); Deyle and Russell, Curr Opin Mol Ther. agosto de 2009; 11(4): 442-447; Asokan et al., Mol Ther. abril de 2012; 20(4): 699-708. Los vectores de AAV que contienen unos escasos 300 pares base de AAV pueden empaquetarse y pueden producir la expresión de proteínas recombinantes. El espacio para ADN exógeno se ve limitado a aproximadamente 4,5 kb. Por ejemplo, un vector de AAV1, 2, 4, 5, o 8 puede utilizarse para introducir ADN en células de PE (como las descritas en Maguire et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med 358: 2240-2248. Maguire et al. (2009). Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. Lancet 374: 1597-1605; Bainbridge et al. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med 358: 2231-2239; Hauswirth et al. (2008). Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. Hum Gene Ther 19: 979-990; Cideciyan et al. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. Proc Natl Acad Sci USA 105: 15112-15117. Cideciyan et al. (2009). Vision 1 year after gene therapy for Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med 361: 725-727; Simonelli et al. (2010). Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. Mol Ther 18: 643-650; Acland, et al. (2005). Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. Mol Ther 12: 1072-1082; Le Meur et al. (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. Gene Ther 14: 292-303; Stieger et al. (2008). Subretinal delivery of recombinant AAV serotype 8 vector in dogs results in gene transfer to neurons in the brain. Mol Ther 16: 916-923; and Vandenbergh et al. (2011). Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey. Sci Transl Med 3: 88ra54). En algunas realizaciones, el vector

de AAV puede incluir (o incluye una secuencia que codifica) un polipéptido de cápside de AAV descrito en el documento WO 2015054653; por ejemplo, una partícula de virus que comprende un polipéptido de cápside de AAV que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15 y 17 del documento WO 2015054653 y una secuencia que codifica PRPF31 como en el presente documento. En algunas realizaciones, el polipéptido de cápside de AAV es como se muestra en la Tabla 1 del documento WO 2015054653, reproducida aquí:

Nodo	Polipéptido (SEQ ID NO)	Ácido nucleico (SEQ ID NO)
Anc80	1	2
Anc81	3	4
Anc82	5	6
Anc83	7	8
Anc84	9	10

En algunas realizaciones, el polipéptido de cápside de AAV es un polipéptido de Anc80, por ej., un polipéptido ejemplar que se muestra en la SEQ ID NO: 19 (Anc80L27); SEQ ID NO: 20 (Anc80L59); SEQ ID NO: 21 (Anc80L60); SEQ ID NO: 22 (Anc80L62); SEQ ID NO: 23 (Anc80L65); SEQ ID NO: 24 (Anc80L33); SEQ ID NO: 25 (Anc80L36) y SEQ ID NO:26 (Anc80L44).

Se ha introducido una variedad de ácidos nucleicos en distintos tipos de células utilizando vectores de AAV (ver por ejemplo, las referencias citadas anteriormente y las citadas en Asokan et al., *Molecular Therapy* (2012); 20 4, 699-708; y Hermonat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470 (1984); Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081 (1985); Wondisford et al., *Mol. Endocrinol.* 2:32-39 (1988); Tratschin et al., *J. Virol.* 51:611-619 (1984); y Flotte et al., *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790 (1993).

También se pueden utilizar retrovirus. El desarrollo de líneas celulares especializadas (denominadas "células empaquetadoras") que producen solo retrovirus sin capacidad de replicación ha aumentado la utilidad de retrovirus para la terapia génica y se caracterizan retrovirus defectivos para el uso en la transferencia genética para fines de terapia génica (para una revisión, ver Katz et al., *Human Gene Therapy* 24:914 (2013)). Un retrovirus sin capacidad de replicación puede empaquetarse en viriones, que pueden utilizarse para infectar células diana a través del uso de un virus asistente por técnicas estándar. Ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM que son conocidos para los expertos en la técnica. Ejemplos de líneas de virus empaquetadores adecuadas para preparar tanto sistemas retrovirales ecotrópicos como anfotrópicos incluyen  $\psi$ Crip,  $\psi$ Cre,  $\psi$ 2 y  $\psi$ Am. Se han utilizado retrovirus para introducir una variedad de genes en muchos tipos de células distintos, incluyendo células epiteliales, *in vitro* y/o *in vivo* (ver por ejemplo, Eglitis, et al. (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos and Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-7644; Kay et al. (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) *J. Immunol.* 150:4104-4115; Patente americana N.º 4,868,116; Patente americana N.º 4,980,286; Solicitud PCT WO 89/07136; Solicitud PCT WO 89/02468; Solicitud PCT WO 89/05345; y Solicitud PCT WO 92/07573).

Otro sistema de suministro génico viral útil en los presentes métodos utiliza vectores derivados de adenovirus. El genoma de un adenovirus puede manipularse, de modo que codifica y expresa un producto génico de interés, pero está inactivado en términos de su capacidad de replicación en un ciclo de vida viral lítico normal. Ver por ejemplo, Berkner et al., *BioTechniques* 6:616 (1988); Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); y Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992). Los expertos en la técnica conocen bien los vectores adenovirales adecuados derivados de la cepa de adenovirus Ad tipo 5 dl324 o de otras cepas de adenovirus (por ej., Ad2, Ad3, Ad7 etc.). Los adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en determinadas circunstancias, ya que no son capaces de infectar células no divisorias y pueden utilizarse para infectar una amplia variedad de tipos de células, incluidas las células epiteliales (Rosenfeld et al., (1992) antes citado). Además, la partícula del virus es relativamente estable y susceptible de purificación y concentración y, como antes, puede modificarse para afectar el espectro de infectividad. Adicionalmente, ADN adenoviral introducido (y ADN extraño contenido en el mismo) no está integrado en el genoma de una célula huésped, sino que se mantiene episomal evitando, de este modo, potenciales problemas que se pueden producir como resultado de mutagénesis por inserción *in situ*, en situaciones en las que el ADN introducido llega a integrarse en el genoma huésped (por ej., ADN retroviral). Aún más, la capacidad de transporte del genoma adenoviral para el ADN extraño es grande (hasta 8 kilobases) con respecto a otros vectores suministro génico (Berkner et al., anteriormente citado; Haj-Ahmand and Graham, *J. Virol.* 57:267 (1986).

En algunos aspectos de la divulgación, un gen que codifica PRPF31 está atrapado en liposomas que portan cargas

positivas sobre su superficie (por ej., lipofectinas), que pueden marcarse con anticuerpos contra antígenos de superficie celular del tejido diana (Mizuno et al., No Shinkei Geka 20:547-551 (1992); publicación PCT WO91/06309; solicitud de patente japonesa 1047381; y publicación de patente europea EP-A-43075).

5 En contextos clínicos, los sistemas de suministro génico para el gen terapéutico se pueden introducir en un sujeto mediante cualquiera de un número de métodos, cada uno de los cuales resulta familiar en la técnica. Aunque se pueden utilizar otros métodos, en algunos aspectos de la divulgación, la ruta de elección de suministro de los vectores de terapia génica en la retina es vía inyección subretiniana. Esto proporciona acceso al RPE y a las células fotorreceptoras de la retina. Distintos serotipos de AAV han demostrado transducir estas poblaciones celulares eficazmente tras la inyección subretiniana en estudios con animales (Vandenberghe et al., PLoS One. 2013;8:e53463. PMID: 3559681; Vandenberghe and Auricchio, Gene Therapy. 2012;19:162-8; Vandenberghe et al., Science translational medicine. 2011;3:88ra54; Dinculescu et al., HumGene Ther. 2005;16:649-63; Boye et al., Mol Ther. 2013;21:509-19; Alexander and Hauswirth, Adv Exp Med Biol. 2008;613:121-8). El enfoque de inyección subretiniana se está utilizando en los ensayos clínicos en curso de terapia de aumento fénico para la degeneración retiniana provocada por mutaciones en los genes *RPE65* y *CHM* de enfermedad genética (Maguire et al., New England Journal of Medicine. 2008;358:2240-8; Bainbridge et al., New England Journal of Medicine. 2008;358:2231-9; Cideciyan et al., Proceedings National Academy Sciences USA. 2008;105:15112-7; Maguire et al., Lancet. 2009;374:1597-605; Jacobson et al., Archives Ophthalmology. 2012;130:9-24; Bennett et al., Science translational medicine. 2012;4:120ra15; MacLaren et al., Lancet. 2014;383:1129-37). Se pueden realizar inyecciones subretinianas utilizando un enfoque quirúrgico estándar (por ej., como se describe en Maguire et al., 2008 anteriormente citado; Bainbridge et al., 2008 antes citado; Cideciyan et al., 2008 supra; MacLaren et al., 2014 antes citado).

La preparación farmacéutica de la construcción de terapia génica puede consistir esencialmente en el sistema de suministro fénico (vector viral y cualquier agente asociado como virus asistentes, proteínas, lípidos y otros) en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la cual está incrustado el vehículo de suministro génico. De modo alternativo, cuando el sistema de suministro génico completo puede producirse de forma intacta a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede comprender una o más células, que producen el sistema de suministro génico.

### 30 Ejemplos

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

35 Ejemplo 1. Mutaciones en factores de procesamiento 3, 8 y 31 de Pre-ARNm provocan disfunción del epitelio pigmentario de la retina

#### Introducción

40 El ayustosoma es una macromolécula de ribonucleoproteína dinámica y ubicua requerida para eliminar intrones de un ARN naciente<sup>1</sup>. Las mutaciones que provocan retinitis pigmentosa (RP) dominante autosómica han sido identificadas en 6 genes que codifican proteínas (PRPF3, PRPF4, PRPF6, PRPF8, PRPF31 y SNRNP200), que se encuentran en el U4/U6.U5 tri-snRNP<sup>2</sup>. Además, las mutaciones en estos genes son la segunda causa más común de RP dominante<sup>3-5</sup>. Definida por una pérdida de visión progresiva y de tardía aparición, la RP es la forma más común de degeneración retiniana heredada, afectando aproximadamente a 1:3500 individuos en el mundo<sup>6</sup>. Es genéticamente heterogénea y muestra los tres modos de herencia Mendeliana<sup>7</sup>. Los tejidos afectados incluyen la retina neural, epitelio pigmentario retiniano (RPE) y coroide<sup>4</sup>. Puesto que los componentes del ayustosoma se expresan de forma ubicua en cada tipo de célula, no está claro por qué las mutaciones en estos factores de ajuste provocan solo RP no sindrómica. Además, el tipo(s) de célula específica en la retina afectada por esta mutación aún no se ha identificado.

50 Hemos notificado previamente la caracterización de modelos de ratón del factor de ajuste de ARN de RP debido a mutaciones en los genes *PRPF3*, *PRPF8* y *PRPF31*, incluyendo ratones desactivados de *Prpf3*, *Prpf8* y *Prpf31*, así como ratones de desactivación de *Prpf3-T494M* y *Prpf8-H2309P*<sup>8, 9</sup>. En base a los resultados de los estudios de estos modelos de ratón y datos de estudios con seres humanos, se cree que las mutaciones en *PRPF3* y *PRPF8* provocan la enfermedad dominante mediante mecanismos de ganancia de función o de dominante negativo, mientras que las mutaciones en *PRPF31* provocan enfermedad vía haploinsuficiencia<sup>9-11</sup>. Los cambios morfológicos en el RPE de envejecimiento, pero no la retina neural, de los ratones de desactivación de *Prpf3-T494M* y *Prpf8-H2309P* y ratones de *Prpf31<sup>+/-</sup>* fueron de particular interés, en los que observamos la pérdida de despliegues basales, la formación de depósitos basales por debajo del RPE y vacuolización en el citoplasma. Estos cambios degenerativos del RPE se observaron en ratones de *Prpf3<sup>T494M/+</sup>*, *Prpf8<sup>H2309P/+</sup>* y *Prpf31<sup>+/-</sup>* heterocigóticos y fueron más pronunciados en ratones de desactivación de *Prpf3<sup>T494M/T494M</sup>* y *Prpf8<sup>H2309P/H2309P</sup>* homocigóticos<sup>8</sup>.

65 El RPE es vital para el bienestar general de la retina<sup>12</sup>. La eliminación diaria de extremidades de los segmentos externos de los fotorreceptores (POS) utilizados es un proceso altamente coordinado y la fagocitosis de POS desprendidos se produce sobre una base rítmica<sup>13</sup>. Algunos receptores implicados en la fagocitosis de POS también participan en la adhesión retiniana general y su ritmo fisiológico<sup>14</sup>. La fagocitosis y adhesión retiniana pico se producen

aproximadamente 2 y 3,5 horas después de la aparición de luz, respectivamente, y se encuentran a sus niveles mínimos aproximadamente 10 horas después<sup>13, 15, 14</sup>. El RPE es un macrófago profesional en el que la unión e internalización de un sustrato está coordinada por receptores en la célula y ligandos del RPE en la matriz interfotorreceptora que une la célula del RPE y fosfatidilserinas en la superficie de los POS, respectivamente<sup>16</sup>. Algunos receptores son comunes entre la fagocitosis y la adhesión, aunque utilizan distintos ligandos<sup>13, 14, 15, 17</sup>. Una pérdida de regulación de cualquiera de estos componentes importantes de la fagocitosis lleva a la pérdida de visión en la enfermedad humana, así como en modelos de roedores<sup>13, 18-20</sup>.

Aquí damos a conocer resultados de estudios de fagocitosis y adhesión de RPE de los modelos de ratón de *Prpf3*<sup>T494M/T494M</sup>, *Prpf8*<sup>H2309P/H2309P</sup> y *Prpf31*<sup>+/-</sup>. Específicamente, hemos medido la fagocitosis en cultivos de RPE primarios a partir de ratones de 2 semanas de edad. Los resultados muestran una deficiencia en fagocitosis, lo cual también demostramos en la línea de células RPE humana, ARPE-19, después de la desactivación mediada por ARNsh de *PRPF31*. Además, se detectó *in vivo* una pérdida de la ritmicidad diurna de fagocitosis y adhesión. De forma interesante, se modifica la localización de los factores clave conocidos por estar implicados en la fagocitosis por células de RPE.

Concluimos que el RPE es probablemente el sitio primario de patogénesis en el factor de ajuste de ARN en RP.

## Materiales y métodos

### Animales

Se ha realizado una investigación en animales según los protocolos aprobados por los Comités Institucionales del Cuidado y Uso de Animales en la Eye and Ear Infirmary de Massachusetts y el Comité Ético de Experimentación Animal de Charles Darwin de la Université Pierre et Marie Curie-Paris. Se empleó un número igual de ratones macho y hembra en cada uno de los siguientes experimentos.

### Cultivo de células de RPE primario

Se aislaron células de RPE de animales de 9-10 días de edad tal como se describe<sup>13</sup>. En resumen, se procesaron copas oculares con 2 mg/ml de hialuronidasa (Sigma) y la retina neural se desprendió de la copa ocular. Se desprendió el RPE de la membrana de Bruch tras su procesamiento con 1 mg/ml de tripsina (Invitrogen) y se cultivó sobre cubreobjetos de cristal de 5 mm. Las células se cultivaron en confluencia durante 5-10 en DMEM con un 10 de FBS a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5%.

### Cultivo celular de macrófagos peritoneales primarios

Se aislaron macrófagos peritoneales residentes tal como se ha descrito anteriormente<sup>21</sup>. Los ratones sometidos a eutanasia se fijaron sobre una tabla de disección y se humectó el pelaje utilizando etanol al 70% en una campana de flujo horizontal. Se separó la piel delicadamente de la pared peritoneal utilizando fórceps y tijeras. Se inyectaron 5 ml de PBS estéril en la cavidad abdominal y se masajó el vientre o se agitó cuidadosamente el cuerpo entero durante 20-30 segundos. Se recogió PBS lentamente de la cavidad y se agruparon muestras de 2 a 3 animales distintos. Se centrifugaron las células durante 10 min a 300 g y se resuspendieron en 1 ml de RPMI con FBS al 10%. Se cultivaron las células en placas de 96 pocillos a 100.000-200.000 células por pocillo y se dejaron adherir durante 2 horas. Se agitaron las placas y se enjuagaron los pocillos una vez utilizando PBS estéril. Las células se mantuvieron en el medio durante 2-3 días a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5%.

### Generación de líneas celulares ARPE-19 y J774.1 de desactivación de ARNsh-PRPF31 y ensayo de viabilidad celular

Se diseñaron tres ARNsh a *PRPF31* humano o *Prpf31* de ratón y se clonaron en el vector pCAG-mir30 que contenía un gen de resistencia a la puromicina. Las secuencias para estos tres ARNsh son las siguientes: ARNsh1 humano - 5'-

TGCTGTTGACAGTGAGCGAGCAGATGAGCTCTTAGCTGATTAGTGAAGCCACAGATGTAATCAGCTAAGAGCTC  
 ATCTGCCTGCCTACTGCCTCGGA-3' (SEQ ID NO:27), ARNsh2 humano - 5'-  
 TGCTGTTGACAGTGAGCGAACCCAACCTGTCCATCATTATTAGTGAAGCCACAGATGTAATAATGATGGACAGGT  
 TGGGTGTGCCTACTGCCTCGGA-3' (SEQ ID NO:28) y ARNsh 3 humano - 5'-  
 TGCTGTTGACAGTGAGCGAGCTGAGTTCCTCAAGGTCAAGTAGTGAAGCCACAGATGTACTTGACCTTGAGGAA  
 CTCAGCCTGCCTACTGCCTCGGA-3' (SEQ ID NO:29); ARNsh1 de ratón - 5'-  
 TGCTGTTGACAGTGAGCGCTCAGTCAAGAGCATTGCCAAGTAGTGAAGCCACAGATGTACTTGCCAATGCTCTT  
 GACTGAATGCCTACTGCCTCGGA-3' (SEQ ID NO:30), ARNsh2 de ratón - 5'-  
 TGCTGTTGACAGTGAGCGACCTGTCTGGCTTCTTCTACTAGTGAAGCCACAGATGTAGTAGAAGAGAAGCCA  
 GACAGGGTGCCTACTGCCTCGGA-3' (SEQ ID NO:31) y ARNsh3 de ratón - 5'-  
 TGCTGTTGACAGTGAGCGAGCCGAGTTCCTCAAGGTCAAGTAGTGAAGCCACAGATGTACTTGACCTTGAGGAA  
 CTCGGCCTGCCTACTGCCTCGGA-3' (SEQ ID NO:32). También clonamos un ARNsh en proteína de fluorescencia  
 verde en este vector como un control no dirigido (5'-  
 TGCTGTTGACAGTGAGCGCTCTCCGAACGTGTATCACGTTTAGTGAAGCCACAGATGTAAACGTGATACACGTTT

GGAGATTGCCTACTGCCTCGGA-3' (SEQ ID NO:33)). Los vectores que contenían ARNsh se linealizaron con *Pst*I y se transfirieron en cultivos ARPE-19 (línea celular de RPE humana, ATCC) o J774A.1 (línea celular de macrófagos de ratón, ATCC) utilizando el kit V de electroporación Amaxa (Amaxa). Las células transfectadas se transfirieron a placas de 6 pocillos y 2 ml de medio de cultivo (1:1 DMEM:F-12 con FBS al 10%). Las células transfectadas se cultivaron durante la noche a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5%. Se seleccionaron las líneas celulares estables con la adición de 1 (ARPE-19) a 1,25 (J774A.1) mg/ml de puomicina (Sigma) 24 horas después de la transfección. El medio y la puomicina se refrescaron cada 2 días durante 10 días. Tras la selección, las cuatro líneas de desactivación de ARPE-19 y las cuatro de J774A.1 se cultivaron hasta confluencia. Para determinar la eficacia de desactivación, se transfirieron temporalmente líneas estables con *PRPF31* marcado con V5 en células ARPE-19 o con *Prpf31* marcado con V5 clonado en un vector Gateway Destination (Invitrogen). Se realizó una transferencia western y se cuantificó *PRPF31* marcado con V5 utilizando un sistema de imágenes infrarrojas Odyssey (Li-Cor). Se realizaron ensayos de viabilidad celular utilizando el ensayo de viabilidad celular luminiscente Cell Titer-Glo (Promega) según las recomendaciones del fabricante. En resumen, se cultivaron células ARPE-19 a una densidad de 1.000 células/pocillo de una placa de cultivo celular de 96 pocillos (Corning, Cat. n.º 3904). Las células se cultivaron durante 3 días en DMEM con un 10% de FBS a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5%. Después de este período, se midió la viabilidad celular mediante luminiscencia y se determinó la significación estadística utilizando la prueba t de Student.

#### Ensayos de fagocitosis *in vitro*

Se aislaron segmentos externos de fotorreceptores de ojos porcinos obtenidos frescos del matadero y se marcaron de forma covalente con tinte FITC (Invitrogen) para ensayos de fagocitosis *in vitro* tal como se ha descrito anteriormente<sup>13</sup>. Se expusieron células de RPE cultivadas confluentes con ~10 de FITC-POS por célula durante 1,5 horas. Se retiraron exhaustivamente POS no específicamente unidos con tres lavados en PBS con 1 mM de MgCl<sub>2</sub> y 0,2 mM de CaCl<sub>2</sub>. Para medir los POS internalizados, algunos pocillos se incubaron con azul de tripano durante 10 min para inactivar la fluorescencia de POS marcados con FITC unidos a la superficie tal como se ha descrito anteriormente<sup>26</sup>. Se fijaron las células con metanol enfriado en hielo y se contratiñeron los núcleos con Hoechst 33258 (Invitrogen) o DAPI (Euromedex). Se sometieron a formación de imágenes las células utilizando un microscopio fluorescente de Nikon Ti2 o Leica DM6000 a 20X. Para los cultivos primarios de RPE, se calcularon las relaciones FITC/DAPI sobre todos los campos de imágenes, correspondiéndose con el número de POS por célula. Se sometieron a recuento los FITC-POS sobre una base celular de 100 células y se determinó el promedio de los tres pocillos para ARPE-19. Para macrófagos peritoneales, se cuantificaron los FITC-POS y los núcleos marcados con DAPI mediante lectura de placas de fluorescencia (Infinite M1000, Magellan 6 software, Tecan). Se calcularon los ratios de unión restando los resultados obtenidos en los pocillos de internalización (tratados con azul de tripano) de los pocillos de fagocitosis (no tratados) totales. Esto se realizó para tres a seis ensayos independientes y se determinó la significación utilizando la prueba t de Student (P < 0,05).

Antes de la fagocitosis, se opsonizaron cultivos confluentes de las líneas de J774A.1 de desactivación estable utilizando reactivo de opsonización de biopartículas de zymosan A (Life Technologies) según el protocolo del fabricante. Tras la opsonización, se aplicó 1 mg de biopartículas de zymosan A reconstituidas en el medio de cultivo a cada pocillo de cultivo de una placa de 96 pocillos. Los cultivos se incubaron a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5% durante 1 hora. La fijación y determinación de los niveles de fagocitosis se realizó tal como se ha descrito anteriormente.

#### Ensayos de ritmo diurno *in vivo*

Los ratones fueron sometidos a eutanasia 2 horas antes de la aparición de luz (-2), a la aparición de luz (0), y 2, 4 y 8 horas (+2, +4, +8) después de la aparición de luz, y se procesaron para la microscopía de electrones o la inclusión de parafina tal como se ha descrito antes<sup>13, 15</sup>. Para la microscopía de electrones se adquirieron todos los reactivos de Electron Microscopy Sciences. Los ratones se perfundieron con glutaraldehído al 2% + paraformaldehído al 2%, y las copas oculares se transfirieron a un tampón de perfusión con la adición de 0,2 M de tampón de cacodilato de sodio. Se tiñeron secciones ultrafinas de sesenta a ochenta nanómetros con citrato de plomo/acetato de uranilo y se sometieron a recuento de fagosomas tempranos de 200 nm fuera del nervio óptico. Un fagosoma temprano se recuenta si cumple los siguientes criterios: 1) está contenido dentro del citoplasma del RPE y 2) tiene una estructura lamelar visible. Para la microscopía de luz, se fijaron las copas oculares en formaldehído/etanol/ácido acético y se sometieron a inclusión en parafina utilizando el sustituto de disolvente Ottix Plus (DiaPath). Se cortaron secciones de cinco micrómetros y se retiró la parafina utilizando el sustituto de disolvente SafeSolv. Las secciones se rehidrataron e incubaron en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 5 % en SSC de 1X durante 10 minutos bajo iluminación para blanquear los pigmentos. Después de bloquear señales no específicas utilizando BSA al 10% en TBS de 1X, las secciones se tiñeron con un anticuerpo de anti-rodopsina (Millipore) y AlexaFluor 488 de anti-IgG de ratón (Invitrogen). Se tiñeron los núcleos con DAPI y los portaobjetos se montaron con Mowiol (preparado según los procedimientos estándar). Se adquirieron pilas de imágenes sobre un microscopio confocal invertido Olympus FV1000 con un objetivo de aceite 60x, un zoom de 4 tiempos y escaneos de 0,41-mm de ancho de paso y se procesaron utilizando el software Adobe Photoshop CS6. Las zonas de al menos 100 mm de retina/RPE ininterrumpidos se sometieron a recuento sobre pilas de 10 escaneos. En cada serie de experimento, los recuentos de fagosomas se normalizaron a la longitud de la retina y se ponderaron. La significación se determinó utilizando la prueba t de Student (P < 0,05) y N = 2-5 para todos los experimentos.

#### Ensayos de adhesión retiniana *in vivo*

Se realizaron ensayos de adhesión retiniana *in vivo* tal como se ha descrito<sup>14</sup>. Brevemente, se retiró el cristalino y la córnea de las copas oculares inmediatamente *post mortem* en tampón salino Hanks con calcio y magnesio. Se realizó un corte radial al nervio óptico y se desprendió la retina neural cuidadosamente de la copa ocular aplanada. Se sometieron a lisis las muestras de retina neural en 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM de EDTA, 150 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS y 1% de Nonidet P-40, con la adición de un cóctel de inhibidores de la proteasa (Sigma) y 1 mM de PMSF. Se cuantificaron las proteínas de sobrenadantes aclarados utilizando el ensayo de Bradford y se sometieron a inmunotransferencia concentraciones iguales para RPE65 (Abcam o Millipore) y beta-actina (Abcam o Sigma). Se extrajeron pigmentos de melanina del sedimento de retina neural insoluble con DMSO al 20%, 2N de NaOH. Se cuantificaron las muestras y estándares de melanina comercial (Sigma) midiendo la absorbancia a 490 nM. Se normalizó la abundancia pigmentaria a la concentración de proteínas en cada muestra para contabilizar distintas producciones de tejido. Se cuantificaron las bandas de inmunotransferencias utilizando el programa Image J v1.46r utilizando una muestra común en todos los blots como referencia, después se ponderaron las señales. La significación se determinó utilizando la prueba t de Student ( $P < 0,05$ ) y  $N = 3-6$  para todos los experimentos.

#### Microscopía de inmunofluorescencia

Para las criosecciones, se fijaron las copas oculares en formaldehído al 2% y se incubaron en sacarosa al 30% durante la noche a 4 °C. Se incrustaron las copas oculares en O.C.T. Se cortó el compuesto (Sakura) y secciones de 10- $\mu$ m. Las secciones se incubaron individualmente en anticuerpos primarios frente a  $\alpha$ v integrina (BD Biosciences),  $\beta$ 5 integrina (Santa Cruz Biotechnology), MerTK (FabGennix), Mfg-E8 y Gas6 (R&D Systems), FAK clon 2A7 (Millipore) y Proteína S (Sigma) seguido por IgG-AlexaFluor 488 (Invitrogen). Se tiñeron núcleos con DAPI, y se montaron con Fluoromount (Electron Microscopy Sciences). Se tomaron las imágenes con un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse Ti utilizando un objetivo de aceite de inmersión 60x. Se procesaron las imágenes con el software NIS-Elements AR (Nikon).

Para las secciones de parafina, se sacrificaron animales en el momento del pico fagocítico y se fijaron los ojos en fijador Davidson durante tres horas a 4 °C, a continuación, se retiró el cristalino y la córnea. Se sometieron a inclusión en parafina las copas oculares y se cortaron secciones de 5- $\mu$ m. Se trataron las secciones como se describe en la sección Ensayos del ritmo diurno *in vivo* y se incubaron individualmente con anticuerpos primarios frente a  $\alpha$ v integrina (Covance),  $\beta$ 5 integrina (Santa Cruz Biotechnology), Mfg-E8, MerTK y Gas6 (R&D Systems), clon FAK 2A7 (Millipore) y Proteína S (Novus Biologicals), seguido por incubación secundaria con IgG-AlexaFluor 488 (Invitrogen). Se tiñeron los núcleos con DAPIE y los portaobjetos se montaron con Mowiol. Se tomaron imágenes con un microscopio de Epifluorescencia Leica DM6000 B utilizando un objetivo de inmersión de aceite 40x. Se procesaron las imágenes con los programas ImageJ v1.46r y Photoshop CS6

#### Resultados

La fagocitosis de RPE se vio reducida en ratones mutantes de *Prpf*

En nuestra caracterización original de los ratones mutantes de *Prpf*, la microscopía de electrones identificó cambios morfológicos en el RPE de mutantes de 1 a 2 años de edad<sup>8</sup>. Aquí, nos propusimos determinar si los cambios funcionales preceden los cambios morfológicos observados. Puesto que el RPE mantiene su actividad fagocítica en cultivo, establecimos cultivos de RPE primario independientes de ratones de *Prpf3*<sup>T494M/T494M</sup>, *Prpf8*<sup>H2309P/H2309P</sup>, *Prpf31*<sup>+/-</sup> de 9-10 días de edad, así como sus correspondientes controles de camada. Una vez los resultados fueron confluentes, utilizamos POS porcinos marcados con FITC y medimos la fagocitosis después de una incubación de 1,5 horas. La Figura 1A (paneles 1-3) muestra imágenes representativas de cultivos primarios que ilustran la unión/captación de POS de las células de RPE de los ratones mutantes de *Prpf* y sus controles de camada, y que demuestra la deficiencia cualitativa en fagocitosis por los ratones mutantes. En los tres modelos mutantes, se observó una disminución del 37-48% de fagocitosis ( $N = 3-5$ ,  $P < 0,05$ ) (Figura 1B). Para justificar la unión no específica de POS a los portaobjetos, realizamos un control negativo, en el cual el ensayo de fagocitosis se realizó sobre cubreobjetos que no contenían células. No observamos ninguna adhesión no específica de los POS a los cubreobjetos (no se muestran los datos).

Investigamos si una etapa específica de la fagocitosis entre la unión e internalización se ve preferentemente alterada en cultivos primarios de RPE de *Prpf31*<sup>+/-</sup>. Después de realizar una exposición fagocítica de 1,5 horas, tratamos las células para inactivar la fluorescencia de superficie (POS enlazados) para cuantificar únicamente los POS internalizados. La unión de POS se vio significativamente reducida por 53 $\pm$ 11% en células mutantes ( $N = 2-5$ ,  $P < 0,05$ ), mientras que no hubo diferencia significativa en las tasas de internalización de POS entre cultivos de tipo salvaje y de RPE mutante (Figura 1C).

Actualmente, existen 64 mutaciones patogénicas conocidas en *PRPF31*, de las cuales muchas resultan en un desplazamiento de marco de lectura y se degradan a través de la vía de desintegración mediada por antisentido<sup>2, 10, 11, 22</sup>. ARPE-19 es una línea celular de RPE humano espontáneamente inmortalizados que es susceptible de transfección y retiene la capacidad de fagocitarse<sup>23</sup>. Para analizar si las mutaciones en los factores de ajuste también afectan la fagocitosis en un modelo de RPE humano, creamos tres líneas celulares de ARPE-19 estables con

desactivación mediada por ARNsh de *PRPF31* utilizando 3 ARNsh distintos dirigidos contra las regiones 5', 3' y media de la transcripción (Figura 1D). También generamos una cuarta línea celular con un ARNsh dirigido contra la proteína fluorescente verde para utilizarla como control. En cada una de las tres líneas celulares estables de ARNsh de *PRPF31* logramos aproximadamente un 60-95% de desactivación de *PRPF31* (datos no mostrados). Los ensayos de viabilidad celular de la desactivación de ARNsh y células ARPE-19 de control no dirigidas mostraron que no se produjo una disminución significativa en asociación con la desactivación de *PRPF31* (Figura 1E). La fagocitosis disminuyó aproximadamente un 40% en cada línea sometida a ensayo, en comparación con la línea de ARNsh de control no dirigida (Figura 1F). Como con el ensayo de fagocitosis realizado sobre RPE primario, también realizamos un ensayo negativo y no se observó ninguna adhesión no específica de los POS a los cubreobjetos (datos no mostrados).

Para determinar si el trastorno de la maquinaria fagocítica es un mecanismo específico de RPE, o puede observarse en otras células fagocíticas, desactivamos *Prpf31* en la línea celular de macrófagos de ratón, J774A.1. Similar a los estudios de desactivación en la línea celular de ARPE-19, se dirigieron tres ARNsh distintos al extremo 5', 3' y medio de la transcripción. Utilizamos el mismo ARNsh de control que los estudios anteriores. En cada una de las líneas celulares de *Prpf31* estables, logramos aproximadamente un 45-70% de desactivación de *Prpf31* (Figura 1A complementaria). No observamos ninguna deficiencia de fagocitosis en ninguna de las líneas sometidas a ensayo (Figura 1B complementaria). Para asegurar que no observamos ninguna adhesión de POS no específica, realizamos un ensayo de control negativo como para la serie de experimentos anteriores (datos no mostrados). Se repitieron experimentos idénticos en macrófagos peritoneales primarios de ratón aislados de ratones de *Prpf31<sup>+/-</sup>*. De forma interesante, ninguna etapa de fagocitosis, es decir, unión o internalización, ni la fagocitosis total se vio afectada en mutante de *Prpf31* en comparación con macrófagos de tipo salvaje (Figura 1C complementaria).

La ritmicidad diurna de la fagocitosis se vio alterada.

La fagocitosis de POS desprendidos por el RPE le sigue un fuerte pico de ritmo diurno sincronizado a las 2 horas después de la aparición de luz y se mantiene relativamente inactivo durante el resto del día<sup>13</sup>. Medimos la fagocitosis *in vivo* en 5 puntos de tiempo por todo el ciclo de luz utilizando o bien microscopía de electrones Figura 2A, mutantes de *Prpf3* y *Prpf8* o bien inmunofluorescencia (Figura 2B, mutante de *Prpf31*), ambas técnicas reconocidas para evaluar el ritmo fagocítico de RPE<sup>13, 15</sup>. Para ratones de control y mutantes de *Prpf3* y *Prpf8* sometimos a recuento fagosomas tempranos que contenían estructuras lamelares en micrografías de electrones (Figura 2A, puntas de flecha, las inserciones muestran estructuras lamelares). Se determinó la ritmicidad de la fagocitosis en ratones de *Prpf31<sup>+/-</sup>* utilizando inclusión de parafina y tinción de rodopsina, y sometimos a recuento los fagosomas presentes en la capa celular de RPE (Figura 2B, puntas de flecha). Observamos un estallido de fagocitosis a las 2 horas después de la aparición de luz en todos los ratones de control, identificando 22-26 fagosomas por 100 mm de sección retiniana (Figura 2C, punto de tiempo +2). En contraste, los ratones mutantes solo mostraron 10-14 fagosomas en el mismo punto de tiempo pico. Durante el resto del ciclo luz:oscuridad, los niveles de fagocitosis se mantienen relativamente bajos en los ratones de control ("horas fuera del pico", 2-12 fagosomas/100 mm de retina), y estos niveles aumentan generalmente en ratones mutantes 6-14 fagosomas/100 mm de retina). Estos resultados muestran una disminución en la intensidad pico fagocítica en los tres tipos de ratones mutantes, con una extensión del tiempo del pico que dura más en mutantes de *Prpf3* y *Prpf8* y empieza antes en mutantes de *Prpf31*. Además, los mutantes de *Prpf8* tiene significativamente más fagosomas en el punto de tiempo fuera del pico (+ 8 h), con respecto a los controles de WT.

Se observa adhesión retiniana reducida en el punto de tiempo pico

La adhesión entre las microvellosidades apicales del RPE y las puntas distales de los POS es conocida por seguir un ritmo sincronizado con la resistencia máxima que se produce 3,5 horas después de la aparición de luz, ligeramente después del pico fagocítico<sup>14, 15</sup>. Se puede determinar la adhesión desprendiendo la retina de una copa ocular aplanada inmediatamente después de la eutanasia cuantificando, a continuación, tanto el contenido de melanina de RPE como los marcadores de proteína de RPE apicales, como RPE65, transferidos a la retina. Utilizando este método, evaluamos la adhesión en ratones mutantes de *Prpf* y controles de camada a las 3,5 y 8,5 horas después de la aparición de luz (adhesión pico y adhesión fuera de pico, respectivamente). Se cuantificó la adhesión de RPE utilizando en primer lugar un procedimiento<sup>14</sup> de cuantificación de melanina estándar, después transferencia western para la presencia de RPE65 para confirmar los resultados de melanina. Observamos una disminución del 56±16% (N = 6, p<0,05, la variación es igual a la desviación estándar) del contenido de melanina en el *Prpf3<sup>T494M/T494M</sup>* en el tiempo pico y ningún cambio significativo en la adhesión en el punto de tiempo fuera de pico (Figura 3A). El análisis de transferencia western confirmó esta observación con una disminución de 30±2% en la adhesión pico (Figura 3B). La cuantificación de melanina en ratones de *Prpf8<sup>H2309P/H2309P</sup>* mostró que la adhesión se redujo significativamente en 61±28% en el punto de tiempo pico y 51±16% en el punto de tiempo fuera de pico (N = 6, P < 0,05 para ambos puntos de tiempo) (Figura 3A). El análisis de la transferencia western confirmó una disminución significativa del 36±11% solo en el punto de tiempo pico (Figura 3B). En los ratones de *Prpf31<sup>+/-</sup>*, la disminución se observó en el punto de tiempo pico (Figura 3A) y se confirmó mediante análisis de inmunotransferencia (N = 3-7, P < 0,05 para ambos paneles) (Figura 3B, 14±1%).

Localización de fagocitosis y marcadores de adhesión

Las células de RPE están altamente polarizadas y su función depende de su polaridad<sup>24</sup>. La localización específica de muchas proteínas expresadas en el RPE resulta importante y las irregularidades en la localización pueden provocar

distrofias retinianas tales como RP o enfermedad de Best<sup>25, 26</sup>. Dado el trastorno del ritmo diurno de tanto la fagocitosis como la adhesión en los tres modelos de ratón mutantes de *Prpf*, nos propusimos caracterizar la localización de las proteínas que son conocidas por ser importantes para estos procesos. Se sometió a ensayo la localización de proteínas sobre criosecciones de ratones mutantes de *Prpf3* y *Prpf8* (Figura 4) y sobre secciones de parafina para ratones mutantes de *Prpf31* (Figura 5).

Tal como se ha mostrado anteriormente, los principales receptores fagocíticos ( $\alpha\beta 5$  integrina y MerTK) se localizan en la superficie<sup>27</sup> apical del RPE mientras que sus ligandos pueden expresarse por todos los POS y RPE<sup>28</sup>. De forma interesante, los ligandos extracelulares expresados en la matriz interfotorreceptora pueden sintetizarse tanto por RPE como por células fotorreceptoras.

Se ha demostrado que la  $\alpha\beta 5$ -integrina con su ligando asociado Mfg-E8 (glóbulo graso de la leche-EGF8) son importantes para la fagocitosis y son los responsables de la ritmicidad diurna de esta función<sup>13, 15</sup>. Además, la  $\alpha\beta 5$ -integrina participa en la adhesión de la retina y su ritmo, aunque con un ligando distinto de Mfg-E8<sup>14, 15, 17</sup>. Las subunidades de la  $\alpha$  integrina se asocian en complejos con varias unidades de  $\beta$  integrina en células de RPE<sup>14</sup>, por lo tanto, es más relevante analizar la expresión de subunidades de  $\beta 5$  integrina. Así, analizamos las subunidades de  $\alpha$  y  $\beta 5$  del receptor de la  $\alpha\beta 5$  integrina por separado. En tejidos de tipo salvaje, cada integrina se localizó primariamente en el lado apical del RPE, con alguna expresión a través de las células de RPE. En los tres tejidos mutantes de *Prpf*, no se observó ningún cambio en la localización de  $\alpha$ -integrina (Figuras 4A, 5A). En contraste, la  $\beta 5$  integrina se localizó principalmente en el lado basal del RPE en los tejidos mutantes de *Prpf3* y *Prpf31*, mientras que mostró expresión igualmente por todas las células de RPE mutantes de *Prpf8*. No observamos ningún cambio en la localización de Mfg-E8 en el RPE ni en los POS, pero parece que se expresa más tanto en mutantes de *Prpf8* como de 31.

La proteína de señalización en dirección descendente FAK (quinasa de adhesión focal) proporciona un enlace de activación secuencial entre los receptores de  $\alpha\beta 5$  integrina y MerTK tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>29, 30, 13</sup>. La FAK se encuentra por todo el RPE y no se observó ningún cambio en este patrón en los ratones mutantes de *Prpf3* o *Prpf31* (Figura 4B, 5B). Sin embargo, los ratones mutantes de *Prpf8*, mostraron una localización de FAK en el lado basal del RPE.

La fagocitosis está dirigida por la activación a tiempo del MerTK mediante fosforilación en el momento del pico de actividad<sup>13, 31, 32</sup>. Gas6 y Proteína S son ligandos de MerTK que pueden estimular la captación de segmentos externos desprendidos *in vitro*<sup>33</sup>. Ambos ligandos son necesarios para la internalización de POS ya que los animales de doble desactivación recapitulan la rápida degeneración retiniana que se produce en ratas en cuyos receptores MerTK están ausentes<sup>34</sup>. La expresión de MerTK en tejidos de tipo salvaje se localiza en ambas membranas apicales y basales del RPE, mientras que el MerTK se localiza únicamente en el lado apical de las células de RPE mutantes de *Prpf31* (Figuras 4C, 5C). El primer ligando de MerTK, Gas 6 se localiza en los POS y la capa apical del RPE en tejidos de tipo salvaje. Se observa una disminución de la expresión en los POS de ratones mutantes de *Prpf3*, con expresión difusa observada por todo el RPE. Los ratones mutantes de *Prpf8* mantienen la expresión de Gas6 en los POS, pero parece perder localización apical en el RPE, también mostrando una expresión difusa por todo el RPE. No se pueden observar cambios de localización en ratones mutantes de *Prpf31*. La expresión del segundo ligando de MerTK, Proteína S se localiza específicamente en los POS en ratones de tipo salvaje y mutantes de *Prpf* (Figuras 4C, 5C).

#### Debate

Aquí, damos a conocer la primera caracterización funcional del RPE en ratones con mutaciones en los factores *Prpf3*, 8 y 31 de ajuste de ARN. Tal como hemos dado a conocer anteriormente, los ratones mutantes no experimentan degeneración de fotorreceptores, aunque sí cambios morfológicos en el RPE<sup>8</sup>. Puesto que el factor de ajuste de ARN de RP es una enfermedad de aparición tardía, estos resultados no son sorprendentes y los modelos nos permiten la capacidad de estudiar los mecanismos que llevan a la aparición de la enfermedad. Nuestros resultados demuestran que el RPE es probable que sea el tipo de célula primaria afectada por mutaciones en estos 3 factores de ajuste de ARN en el ratón, y en humanos dada la similar deficiencia fagocítica observada en células ARPE-19 humanas de desactivación de PRPF31. Mientras que el mecanismo exacto de la patogénesis de la enfermedad está por identificar, estos datos permiten que la investigación se centre en el RPE. Por ejemplo, la identificación del RPE como el tipo de célula primaria afectada en estos trastornos hará posible extender estos estudios a células humanas, tal como ahora es posible generar células de RPE a partir de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) de pacientes con enfermedades retinianas heredadas<sup>42-45</sup>.

#### Referencias para Ejemplo 1

- [1] Will CL, Luhrmann R: Spliceosome Structure and Function. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2011, 3.
- [2] Liu MM, Zack DJ: Alternative splicing and retinal degeneration. Clinical Genetics 2013, 84: 142-149.
- [3] Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS: Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. Archives of Ophthalmology 2007, 125:151-158.

- [4] Hartong DT, Berson EL, Dryja TP: Retinitis pigmentosa. *The Lancet* 2006, 368: 1795-809.
- [5] Sullivan LS, Bowne SJ, Reeves MJ, Blain D, Goetz K, NDifor V, Vitez S, Wang X, Tumminia SJ, Daiger SP: Prevalence of Mutations in eyeGENE Proband With a Diagnosis of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2013, 54:6255-61.
- [6] Nishiguchi KM, Rivolta C: Genes Associated with Retinitis Pigmentosa and Allied Diseases Are Frequently Mutated in the General Population. *PLoS ONE* 2012, 7.
- [7] Neveling K, Collin RWJ, Gilissen C, van Huet RAC, Visser L, Kwint MP, Gijzen SJ, Zonneveld MN, Wieskamp N, de Ligt J, Siemiakowska AM, Hoefsloot LH, Buckley MF, Kellner U, Branham KE, den Hollander AI, Hoischen A, Hoyng C, Klevering BJ, van den Born LI, Veltman JA, Cremers FPM, Scheffer H: Next-generation genetic testing for retinitis pigmentosa. *Human Mutation* 2012, 33:963-72.
- [8] Graziotto JJ, Farkas MH, Bujakowska K, Deramaudt BM, Zhang Q, Nandrot EF, Inglehearn CF, Bhattacharya SS, Pierce EA: Three gene-targeted mouse models of RNA splicing factor RP show late-onset RPE and retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2011, 52:190-8.
- [9] Graziotto JJ, Inglehearn CF, Pack MA, Pierce EA: Decreased Levels of the RNA Splicing Factor Prpf3 in Mice and Zebrafish Do Not Cause Photoreceptor Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2008, 49:3830-8.
- [10] Rio Frio T, Wade NM, Ransijn A, Berson EL, Beckmann JS, Rivolta C: Premature termination codons in PRPF31 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *The Journal of Clinical Investigation* 2008, 118:1519-31.
- [11] Venturini G, Rose AM, Shah AZ, Bhattacharya SS, Rivolta C: CNOT3 is a modifier of PRPF31 mutations in retinitis pigmentosa with incomplete penetrance. *PLoS Genetics* 2012, 8.
- [12] Kevany BM, Palczewski K: Phagocytosis of Retinal Rod and Cone Photoreceptors. *Physiology* 2010, 25:8-15. [13] Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC: Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *The Journal of Experimental Medicine* 2004, 200:1539-45.
- [14] Nandrot EF, Anand M, Sircar M, Finnemann SC: Novel role for alphavbeta5-integrin in retinal adhesion and its diurnal peak. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 2006, 290(4):C1256-62.
- [15] Nandrot EF, Anand M, Almeida D, Atabai K, Sheppard D, Finnemann SC: Essential role for MFG-E8 as ligand for alphavbeta5 integrin in diurnal retinal phagocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, 104:12005-10.
- [16] Ruggiero L, Connor MP, Chen J, Langen R, Finnemann SC: Diurnal, localized exposure of phosphatidylserine by rod outer segment tips in wild-type but not Itgb5<sup>-/-</sup> or Mfge8<sup>-/-</sup> mouse retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012, 109:8145-8.
- [17] Nandrot EF, Finnemann SC: Lack of alphavbeta5 integrin receptor or its ligand MFG-E8: distinct effects on retinal function. *Ophthalmic Research* 2008, 40:120-3.
- [18] Nandrot E, Dufour EM, Provost AC, Péquignot MO, Bonnel S, Gogat K, Marchant D, Rouillac C, Sépulchre de Condé B, Bihoreau M-T: Homozygous Deletion in the Coding Sequence of the c-mer Gene in RCS Rats Unravels General Mechanisms of Physiological Cell Adhesion and Apoptosis. *Neurobiology of Disease* 2000, 7:586-99.
- [19] Issa PC, Bolz HJ, Ebermann I, Domeier E, Holz FG, Scholl HP: Characterisation of severe rod-cone dystrophy in a consanguineous family with a splice site mutation in the MERTK gene. *British Journal of Ophthalmology* 2009, 93:920-5.
- [20] Ostergaard E, Duno M, Batbayli M, Vilhelmsen K, Rosenberg T: A novel MERTK deletion is a common founder mutation in the Faroe Islands and is responsible for a high proportion of retinitis pigmentosa cases. *Molecular Vision* 2011, 17:1485.
- [21] Davies JQ and Gordon S: Isolation and culture of murine macrophages. *Basic cell culture protocols* 2005: 91-103.
- [22] Stenson PD, Mort M, Ball EV, Shaw K, Phillips AD, Cooper DN: The Human Gene Mutation Database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine. *Human Genetics* 2013:1-9.
- [23] Mao Y, Finnemann S: Analysis of Photoreceptor Outer Segment Phagocytosis by RPE Cells in Culture. *Retinal*

Degeneration. Edited by Weber BHF, Langmann T. Humana Press, 2013. pp. 285-95.

[24] Marmorstein AD: The Polarity of the Retinal Pigment Epithelium. *Traffic* 2001, 2:867-72.

5 [25] Davidson AE, Millar ID, Urquhart JE, Burgess-Mullan R, Shweikh Y, Parry N, O'Sullivan J, Maher GJ, McKibbin M, Downes SM, Lotery AJ, Jacobson SG, Brown PD, Black GC, Manson FD: Missense mutations in a retinal pigment epithelium protein, bestrophin-1, cause retinitis pigmentosa. *American journal of Human Genetics* 2009, 85:581-92.

10 [26] Lopes VS, Gibbs D, Libby RT, Aleman TS, Welch DL, Lillo C, Jacobson SG, Radu RA, Steel KP, Williams DS: The Usher 1B protein, MYO7A, is required for normal localization and function of the visual retinoid cycle enzyme, RPE65. *Human Molecular Genetics* 2011, 20:2560-70.

15 [27] Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD, Rodriguez-Boulan E: Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin for binding but not for internalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997, 94:12932-7.

[28] Prasad D, Rothlin CV, Burrola P, Burstyn-Cohen T, Lu Q, Garcia de Frutos P, Lemke G: TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Molecular and Cellular Neuroscience* 2006, 33:96-108.

20 [29] Finnemann SC: Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *The EMBO Journal* 2003, 22:4143-54.

[30] Qin S, Rodrigues GA: Roles of  $\alpha\text{v}\beta 5$ , FAK and MerTK in oxidative stress inhibition of RPE cell phagocytosis. *Experimental Eye Research* 2012, 94:63-70.

25 [31] Nandrot EF, Silva KE, Scelfo C, Finnemann SC: Retinal pigment epithelial cells use a MerTK-dependent mechanism to limit the phagocytic particle binding activity of  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 2012, 104:326-41.

30 [32] Hall MO, Obin MS, Heeb MJ, Burgess BL, Abrams TA: Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research* 2005, 81:581-91.

[33] Burstyn-Cohen T, Lew ED, Través PG, Burrola PG, Hash JC, Lemke G: Genetic Dissection of TAM Receptor-Ligand Interaction in Retinal Pigment Epithelial Cell Phagocytosis. *Neuron* 2012, 76:1123-32.

35 [34] Yin J, Brocher J, Fischer U, Winkler C: Mutant Prpf31 causes pre-mRNA splicing defects and rod photoreceptor cell degeneration in a zebrafish model for Retinitis pigmentosa. *Molecular Neurodegeneration* 2011, 6:1-18.

40 [35] Masland RH: Cell populations of the retina: the Proctor lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2011, 52:4581-91.

[36] Finnemann SC, Nandrot EF: MerTK activation during RPE phagocytosis in vivo requires  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2006, 572:499-503.

45 [37] Gal A, Li Y, Thompson DA, Weir J, Orth U, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Vollrath D: Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nature Genetics* 2000, 26:270-1.

50 [38] Mackay DS, Henderson RH, Sergouniotis PI, Li Z, Moradi P, Holder GE, Waseem N, Bhattacharya SS, Al-dahmesh MA, Alkuraya FS: Novel mutations in MERTK associated with childhood onset rod-cone dystrophy. *Molecular Vision* 2010, 16:369-377.

[39] Tschernutter M, Jenkins S, Waseem N, Saihan Z, Holder G, Bird A, Bhattacharya S, Ali R, Webster A: Clinical characterisation of a family with retinal dystrophy caused by mutation in the Mertk gene. *British Journal of Ophthalmology* 2006, 90:718-23.

55 [40] Taniguchi-Ikeda M, Kobayashi K, Kanagawa M, Yu C-c, Mori K, Oda T, Kuga A, Kurahashi H, Akman HO, DiMauro S: Pathogenic exon-trapping by SVA retrotransposon and rescue in Fukuyama muscular dystrophy. *Nature* 2011, 478:127-31.

60 [41] Dell'Angelica EC: AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade *Current Opinion in Cell Biology* 2009, 21:552-9.

65 [42] Farkas MH, Grant GR, White JA, Sousa ME, Consugar MB, Pierce EA: Transcriptome analyses of the human retina identify unprecedented transcript diversity and 3.5 Mb of novel transcribed sequence via significant alternative splicing and novel genes. *BMC Genomics* 2013, 14: 486.

[43] Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, Clegg DO: Rapid and Efficient Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Retinal Pigmented Epithelium. *Stem Cells Translational Medicine* 2013, 2:384-93.

5 [44] Meyer JS, Howden SE, Wallace KA, Verhoeven AD, Wright LS, Capowski EE, Pinilla I, Martin JM, Tian S, Stewart R: Optic Vesicle-like Structures Derived from Human Pluripotent Stem Cells Facilitate a Customized Approach to Retinal Disease Treatment. *Stem Cells* 2011, 29:1206-18.

10 [45] Singh R, Phillips MJ, Kuai D, Meyer J, Martin JM, Smith MA, Perez ET, Shen W, Wallace KA, Capowski EE: Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2013, 54:6767-78.

Ejemplo 2. Desarrollo y caracterización funcional de células ARPE-19 desactivadas de *PRPF31* utilizando técnicas de edición genómica

15 Tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, se identificó el epitelio pigmentario retiniano (RPE) como el sitio de patogénesis en los tres modelos de ratón mutantes de ajuste de ARN de retinitis pigmentosa (RP). Sin embargo, estos resultados necesitaban confirmarse en RPE humano. Con la aparición de las técnicas de edición genómica de CRISPR/Cas9, se desarrollaron modelos de líneas celulares humanas para estas formas de enfermedad. Este ejemplo  
20 presenta el uso de la edición genómica de CRISPR/Cas9 para la desactivación de *PRPF31* por primera vez en líneas celulares humanas y para la caracterización del efecto sobre la función del RPE.

25 Se diseñó un ARN guía (ARNg) de 20 pb al exón 7 de *PRPF31* y se clonó en un vector pCAG que contenía la secuencia de armazón de ARNg. El vector de ARNg se co-transfectó con un vector pCAG-Cas9-GFP en células ARPE-19. Se clasificaron células positivas de GFP en una sola célula en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos y se cultivaron hasta confluencia. Se aisló ADN de cada clon y la región alrededor del sitio de corte pronosticado fue secuenciado por Sanger para identificar aquellos que mostraban el corte correcto y unión de extremos no homólogos (NHEJ). Se seleccionaron cinco líneas de NHEJ para su caracterización adicional utilizando ensayos tanto de qRT-PCR como de fagocitosis para cuantificar la captación de segmento externo de fotorreceptor marcado con FITC con  
30 citometría de flujo. Estas líneas se mantuvieron como cultivos confluentes durante 3 semanas para garantizar la polarización y expresión máxima de genes específicos de RPE.

35 Aproximadamente el 25% de los clones individualmente validados después de su transfección mostraron NHEJ con supresiones entre 2 y 11 bases y un clon tenía 1 inserción de base (Figura 6). Solo se identificaron indeles heterocigóticos, consistentes con los informes anteriores de que las mutaciones en el *PRPF31* provocan la enfermedad por medio de haploinsuficiencia. La expresión de *PRPF31* en 4 de los 5 clones editados de genoma se redujo significativamente ( $P < 0,05$ ) por un 50-80%, en comparación con el control de tipo salvaje. Para confirmar que estos cambios fueron un resultado de edición genómica, se determinaron los niveles de expresión del modificador de *PRPF31*, *CNOT3*. Una línea tuvo un doble aumento en la expresión, lo cual puede explicar los niveles reducidos de  
40 *PRPF31* en esa línea. El análisis de citometría de flujo de captación de POS demostró que la fagocitosis se vio reducida por 10-60 veces en las líneas editadas de genomas.

45 Actualmente, resulta complicado estudiar el mecanismo de la enfermedad del factor de ajuste de ARN en RP en modelos humanos. Hemos creado un modelo de línea celular humana para la enfermedad asociada a *PRPF31* que imita los hallazgos en los modelos de ratón. Estas líneas nos permitirán estudiar la enfermedad en un modelo más relevante, permitiéndonos la capacidad de examinar el ajuste más profundamente. Además, también podemos estudiar el efecto del aumento génico mediado por AAV de *PRPF31* en la patogénesis de la enfermedad y el rescate de deficiencias funcionales

50 Por ejemplo, tal como se indica en el Ejemplo 1, los segmentos externos de los fotorreceptores (POS) se renuevan completamente cada 10 días por un crecimiento continuo en sus bases regulado por el desprendimiento de discos en sus puntas distales (Young RW. The renewal of photoreceptor cell outer segments. *Journal of Cell Biology*. 1967;33:61-72; Young RW. Shedding of discs from rod outer segments in the rhesus monkey. *JUltrastructRes*. 1971;34:190-203). La fagocitosis del material de POS utilizado por el RPE es esencial para la adecuada función retiniana, ya que su  
55 ausencia o retraso lleva a la pérdida de visión (Dowling JE, Sidman RL. Inherited retinal dystrophy in the rat. *Journal Cell Biology*. 1962;14:73-109; Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *Journal Experimental Medicine*. 2004;200:1539-45). La fagocitosis de POS se redujo en cultivos de células de RPE primarias en ratones mutantes de 10 días de edad, y esto se replicó por la desactivación mediada por ARNsh de *PRPF31* en  
60 células ARPE-19 humanas (Ejemplo 1, Figura 1). La ritmicidad diurna de fagocitosis *in vivo* también se perdió, y la resistencia de la adhesión entre microvellosidades apicales de RPE y POS disminuyeron en el momento de adhesión pico en los 3 modelos mutantes (Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *Journal Experimental Medicine*. 2004;200:1539-45; Nandrot EF, Finnemann SC. Lack of alphavbeta5 integrin receptor or its  
65 ligand MFG-E8: distinct effects on retinal function. *Ophthalmic Research*. 2008;40:120-3).

Ejemplo 3. Desarrollo y caracterización funcional de células madre pluripotentes inducidas humanas (hiPSC) desactivadas de *PRPF31* utilizando técnicas de edición genómica

Se utilizó la edición genómica de CRISPR/Cas9 para desactivar *PRPF31* en hiPSC normales (Hou Z, Zhang Y, Propson NE, Howden SE, Chu LF, Sontheimer EJ, Thomson JA. Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013;110:15644-9; Xue H, Wu J, Li S, Rao MS, Liu Y. Genetic Modification in Human Pluripotent Stem Cells by Homologous Recombination and CRISPR/Cas9 System. Methods Molecular Biology. 2014; Peters DT, Cowan CA, Musunuru K. Genome editing in human pluripotent stem cells. StemBook. Cambridge (MA) 2013; Ding Q, Regan SN, Xia Y, Ostrom LA, Cowan CA, Musunuru K. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs. Cell Stem Cell. 2013;12:393-4. PMID: 3925309) tal como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 2.

El desarrollo de la tecnología de hiPSC hace posible ahora determinar si las células de RPE humanas se ven afectadas de forma similar por mutaciones en los genes de factor de ajuste de ARN, ya que las hiPSC pueden diferenciarse fácilmente en células de RPE (ver Ejemplo 1, Singh R, Phillips MJ, Kuai D, Meyer JT, Martin J, Smith M, Shen W, Perez ET, Wallace KA, Capowski EE, Wright L, Gamm DM. Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2013;54:6767-78; Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, Friedrich AM, Hinman CR, Johnson LV, Clegg DO. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. Stem Cells. 2009;27:2427-34; Okamoto S, Takahashi M. Induction of retinal pigment epithelial cells from monkey iPS cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2011;52:8785-90; Ukrohne TU, Westenskow PD, Kurihara T, Friedlander DF, Lehmann M, Dorsey AL, Li W, Zhu S, Schultz A, Wang J, Siuzdak G, Ding S, Friedlander M. Generation of retinal pigment epithelial cells from small molecules and OCT4 reprogrammed human induced pluripotent stem cells. Stem cells translational medicine. 2012;1:96-109; Westenskow PD, Moreno SK, Krohne TU, Kurihara T, Zhu S, Zhang ZN, Zhao T, Xu Y, Ding S, Friedlander M. Using flow cytometry to compare the dynamics of photoreceptor outer segment phagocytosis in iPS-derived RPE cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2012;53:6282-90; Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, Hinman CR, Coffey PJ, Clegg DO. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. Stem cells translational medicine. 2013;2:384-93). Las células de RPE derivadas de hiPSC comparten muchas características con las células de RPE nativas, incluyendo uniones estrechas funcionales, fagocitosis de POS y polarización (Ibid).

Para obtener RPE de hiPSC, se generan cuerpos embrioides (EB), adheridos a placas recubiertas de laminina y cultivados en medio de diferenciación retiniana (RDM) durante 60-90 días. Las regiones de células pigmentadas después se microdisecarán, disociarán y se pasarán sobre insertos de transwell según los protocolos establecidos (Singh R, Phillips MJ, Kuai D, Meyer JT, Martin J, Smith M, Shen W, Perez ET, Wallace KA, Capowski EE, Wright L, Gamm DM. Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2013;54:6767-78; Phillips MJ, Wallace KA, Dickerson SJ, Miller MJ, Verhoeven AD, Martin JM, Wright LS, Shen W, Capowski EE, Percin EF, Perez ET, Zhong X, Canto-Soler MV, Gamm DM. Blood-derived human iPS cells generate optic vesicle-like structures with the capacity to form retinal laminae and develop synapses. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2012;53:2007-19). A continuación, se cultivarán células durante unos 30-60 días adicionales, cuando se reformen las monocapas pigmentadas. Antes del uso en experimentos, se medirá la resistencia transepitelial (TER) de las monocapas de hiPSC-RPE cultivadas sobre insertos de Transwell; solo aquellos cultivados con TER > 150Ωcm<sup>2</sup> se seleccionarán para el estudio adicional. Para cada experimento, incluiremos duplicados para cada mutación de interés y células de control de tipo salvaje, que se cultivarán y analizarán en paralelo. La estructura y función de las células de RPE derivadas de hiPSC se caracterizará utilizando varios métodos:

Estructura. Se utiliza microscopía de luz y microscopía de electrones para evaluar la polarización, incluyendo la formación de procesos apicales y despliegues basolaterales (Ejemplo 1, Garland DL, Fernandez-Godino R, Kaur I, Speicher KD, Harnly JM, Lambris JD, Speicher DW, Pierce EA. Mouse genetics and proteomic analyses demonstrate a critical role for complement in a model of DHRD/ML, an inherited macular degeneration. Human Molecular Genetics. 2013;Sept. 4. [Epub ahead of print]; Liu Q, Lyubarsky A, Skalet JH, Pugh EN, Jr., Pierce EA. RP1 is required for the correct stacking of outer segment discs. Investigative Ophthalmology & Visual Science. 2003;44:4171-83).

Fagocitosis. Tal como se ha descrito anteriormente, los cultivos primarios de células de RPE de los ratones de *Prpf3*<sup>T494M/T494M</sup>, *Prpf8*<sup>H2309P/H2309P</sup> y *Prpf31*<sup>+/-</sup> tienen una capacidad significativamente disminuida para fagocitar POS (Figura 1). Evaluaremos la función fagocítica de células de RPE derivadas de hiPSC utilizando técnicas establecidas (ver Ejemplo 1; Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD, Rodriguez-Boulan E. Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. Proc Natl Acad Sci USA. 1997;94:12932-7; Singh R, Shen W, Kuai D, Martin JM, Guo X, Smith MA, Perez ET, Phillips MJ, Simonett JM, Wallace KA, Verhoeven AD, Capowski EE, Zhang X, Yin Y, Halbach PJ, Fishman GA, Wright LS, Pattnaik BR, Gamm DM. iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. Human Molecular Genetics. 2013;22:593-60.)

Para evaluar la polaridad de las células de RPE derivadas de hiPSC se inmunotiñen secciones de vibratome de células

transfectadas de forma estable cultivadas en Transwells con anticuerpos contra marcadores de células de RPE establecidas utilizando técnicas establecidas (Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *Journal Experimental Medicine*. 2004;200:1539-45; Nandrot EF, Finnemann SC. Lack of alphavbeta5 integrin receptor or its ligand MFG-E8: distinct effects on retinal function. *Ophthalmic Research*. 2008;40:120-3; Finnemann SC, Nandrot EF. MerTK activation during RPE phagocytosis *in vivo* requires alphaVbeta5 integrin. *Advances Experimental Medicine Biology*. 2006;572:499-503). Las células teñidas se evaluarán mediante microscopía confocal y la distribución y cantidades relativas de las proteínas de marcador se compararán en células de RPE derivadas de hiPSC mutantes y de control. Los niveles de estos marcadores de células de RPE también se evaluarán en células diferenciadas mediante transferencia western (Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *Journal Experimental Medicine*. 2004;200:1539-45).

Los cambios en el fenotipo del RPE observados en los hiPSC editados del genoma se confirmaron utilizando hiPSC de pacientes con factor de ajuste de ARN de RP. Se han identificado pacientes y familias con RP debido a mutaciones en el gen PRPF31 y se han generado hiPSC utilizando fibroblastos de un miembro de la familia afectado o no afectado de cada una de las 3 familias. En resumen, los fibroblastos se reprograman utilizando vectores de plásmidos no integradores, que contienen oriP que codifican siete factores reprogramadores (OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc, KLF4 y SV40 antígeno T grande), tal como se ha descrito ( Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 2009;324:797-801). Las líneas de hiPSC con cariotipos normales y que están confirmadas que son pluripotentes por estudios de teratoma y expresión de los marcadores de pluripotencia OCT4, SSEA4, NANOG y TRA-1-81 se seleccionarían para un estudio adicional (Singh R, Shen W, Kuai D, Martin JM, Guo X, Smith MA, Perez ET, Phillips MJ, Simonett JM, Wallace KA, Verhoeven AD, Capowski EE, Zhang X, Yin Y, Halbach PJ, Fishman GA, Wright LS, Pattnaik BR, Gamm DM. iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Human Molecular Genetics*. 2013;22:593-607; Singh R, Phillips MJ, Kuai D, Meyer JT, Martin J, Smith M, Shen W, Perez ET, Wallace KA, Capowski EE, Wright L, Gamm DM. Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013;54:6767-78; Meyer JS, Howden SE, Wallace KA, Verhoeven AD, Wright LS, Capowski EE, Pinilla I, Martin JM, Tian S, Stewart R, Pattnaik B, Thomson JA, Gamm DM. Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment. *Stem Cells*. 2011;29:1206-18). Después de confirmar que cada línea de hiPSC porta la mutación esperada, se caracteriza la función del RPE derivado de hiPSC en células de pacientes y se compara con miembros de la familia no afectados utilizando las técnicas descritas anteriormente.

#### Ejemplo 4. Vectores de AAV para terapia de aumento génico.

La identificación de células de RPE que es probable que sean las células primarias afectadas en el factor de ajuste de ARN en RP (ver Ejemplo 1) crea una oportunidad de utilizar la terapia de aumento génico para enfermedades provocadas por mutaciones en el PRPF31. Para conseguir este objetivo, hemos desarrollado vectores de AAV para expresar PRPF31 humano en células de RPE, y hemos sometido a ensayo la capacidad del PRPF31 derivado de AAV en mejorar el fenotipo en células de RPE cultivadas y, a continuación, en ratones de Prpf31<sup>+/-</sup> *in vivo*. El AAV es el vector de suministro génico preferente para trastornos retinianos en base al éxito de los ensayos clínicos de la terapia génica para RPE65 LCA y coroideremia, así como otros estudios clínicos y preclínicos (Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Jr., Mingozzi F, Bencicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM, Rossi S, Lyubarsky A, Arruda VR, Konkle B, Stone E, Sun J, Jacobs J, Dell'Osso L, Hertle R, Ma JX, Redmond TM, Zhu X, Hauck B, Zeleniaia O, Shindler KS, Maguire MG, Wright JF, Volpe NJ, McDonnell JW, Auricchio A, High KA, Bennett J. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *New England Journal of Medicine*. 2008;358:2240-8. PMID: 2829748; Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N, Petersen-Jones S, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, Fitzke FW, Carter BJ, Rubin GS, Moore AT, Ali RR. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *New England Journal of Medicine*. 2008;358:2231-9; Cideciyan AV, Aleman TS, Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S, Roman AJ, Pang JJ, Sumaroka A, Windsor EA, Wilson JM, Flotte TR, Fishman GA, Heon E, Stone EM, Byrne BJ, Jacobson SG, Hauswirth WW. Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proceedings National Academy Sciences USA*. 2008;105:15112-7. PMID: 2567501; Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F, Mingozzi F, Bencicelli JL, Ying GS, Rossi S, Fulton A, Marshall KA, Banfi S, Chung DC, Morgan JI, Hauck B, Zeleniaia O, Zhu X, Raffini L, Coppieters F, De Baere E, Shindler KS, Volpe NJ, Surace EM, Acerra C, Lyubarsky A, Redmond TM, Stone E, Sun J, McDonnell JW, Leroy BP, Simonelli F, Bennett J. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*. 2009;374:1597-605; Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, Peden MC, Aleman TS, Boye SL, Sumaroka A, Conlon TJ, Calcedo R, Pang JJ, Erger KE, Olivares MB, Mullins CL, Swider M, Kaushal S, Feuer WJ, Iannaccone A, Fishman GA, Stone EM, Byrne BJ, Hauswirth WW. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Archives Ophthalmology*. 2012;130:9-24; Bennett J, Ashtari M, Wellman J, Marshall KA, Cyckowski LL, Chung DC, McCague S, Pierce EA, Chen Y, Bencicelli JL, Zhu X, Ying GS, Sun J, Wright JF, Auricchio A, Simonelli F, Shindler KS, Mingozzi F, High KA, Maguire AM. AAV2 gene therapy read-ministration in three adults with congenital blindness. *Science translational medicine*. 2012;4:120ra15; Bowles DE, McPhee SW, Li C, Gray SJ, Samulski JJ, Camp AS, Li J,

Wang B, Monahan PE, Rabinowitz JE, Grieger JC, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Xiao X, Samulski RJ. Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2012;20:443-55. PMID: 3277234; Maclachlan TK, Lukason M, Collins M, Munger R, Isenberger E, Rogers C, Malatos S, Dufresne E, Morris J, Calcedo R, Veres G, Scaria A, Andrews L, Wadsworth S. Preclinical safety evaluation of AAV2-sFLT01- a gene therapy for age-related macular degeneration. *Molecular Therapy*. 2011;19:326-34. PMID: 3034852; Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P, Riddell A, Pie AJ, Harrington C, O'Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CY, Kay MA, Zhou J, Spence Y, Morton CL, Allay J, Coleman J, Sleep S, Cunningham JM, Srivastava D, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Gray JT, Reiss UM, Nienhuis AW, Davidoff AM. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *New England Journal of Medicine*. 2011;365:2357-65. PMID: 3265081).

El AAV tiene un registro de seguridad excepcional en estudios clínicos de fase temprana y también presenta un menor riesgo de genotoxicidad en comparación con otros sistemas de vectores ya que los genomas de AAV son estables en una forma episómica en células terminalmente diferenciadas tales como células fotorreceptoras y de RPE (Yang GS, Schmidt M, Yan Z, Lindbloom JD, Harding TC, Donahue BA, Engelhardt JF, Kotin R, Davidson BL. Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *Jvirol*. 2002;76:7651-60; Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, Aleman TS, Cideciyan AV, Bennicelli J, Dejneka NS, Pearce-Kelling SE, Maguire AM, Palczewski K, Hauswirth WW, Jacobson SG. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Molecular Therapy*. 2005;12:1072-82).

Se desarrollan varios sistemas de vectores de AAV para *PRPF31*, con distintas elecciones de promotor y serotipos de cápside. Con respecto a los promotores, los vectores pueden incluir promotores que dirigen la expresión en muchos tipos de células (por ej., CAG o CASI), células de RPE (por ej., promotores de proteínas específicas de RPE tales como MD2, RPE65, RLBP1, RGR o TIMP3) y células fotorreceptoras (RHO) (Esumi N, Oshima Y, Li Y, Campochiaro PA, Zack DJ. Analysis of the VMD2 promoter and implication of E-box binding factors in its regulation. *Journal Biological Chemistry*. 2004;279:19064-73; Guziewicz KE, Zangerl B, Komaromy AM, Iwabe S, Chiodo VA, Boye SL, Hauswirth WW, Beltran WA, Aguirre GD. Recombinant AAV-Mediated BEST1 Transfer to the Retinal Pigment Epithelium: Analysis of Serotype-Dependent Retinal Effects. *PLoS One*. 2013;8:e75666; Allocca M, Mussolino C, Garcia-Hoyos M, Sanges D, Iodice C, Petrillo M, Vandenberghe LH, Wilson JM, Marigo V, Surace EM, Auricchio A. Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virol*. 2007;81:11372-80). Los componentes de los vectores de AAV se sintetizan utilizando secuencias de PRPF31 optimizadas por codones para mejorar el nivel y duración de la expresión genética (I11 CR, Chiou HC. Gene therapy progress and prospects: recent progress in transgene and RNAi expression cassettes. *Gene Therapy*. 2005;12:795-802; Foster H, Sharp PS, Athanasopoulos T, Trollet C, Graham IR, Foster K, Wells DJ, Dickson G. Codon and mRNA sequence optimization of microdystrophin transgenes improves expression and physiological outcome in dystrophic mdx mice following AAV2/8 gene transfer. *Molecular Therapy*. 2008;16:1825-32; Sack BK, Merchant S, Markusic DM, Nathwani AC, Davidoff AM, Byrne BJ, Herzog RW. Transient B cell depletion or improved transgene expression by codon optimization promote tolerance to factor VIII in gene therapy. *PLoS One*. 2012;7:e37671). En estudios preliminares, el PRPF31 optimizado por codones produjo proteína de PRPF31 de longitud completa en células ARPE-19. Los vectores preparados codifican el genoma de vector mínimo necesario para conseguir la expresión óptima. Dado que nos interesa principalmente transducir células de RPE, utilizaremos AAV2 como un serotipo de control, ya que este vector es conocido por transducir células monocapa cultivadas y transducir el RPE bien *in vivo* (Pang JJ, Lauramore A, Deng WT, Li Q, Doyle TJ, Chiodo V, Li J, Hauswirth WW. Comparative analysis of *in vivo* and *in vitro* AAV vector transduction in the neonatal mouse retina: effects of serotype and site of administration. *Vision Research*. 2008;48:377-85; Vandenberghe LH, Bell P, Maguire AM, Cearley CN, Xiao R, Calcedo R, Wang L, Castle MJ, Maguire AC, Grant R, Wolfe JH, Wilson JM, Bennett J. Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey. *Science translational medicine*. 2011;3:88ra54; Tolmachova T, Tolmachov OE, Barnard AR, de Silva SR, Lipinski DM, Walker NJ, Maclaren RE, Seabra MC. Functional expression of Rab escort protein 1 following AAV2-mediated gene delivery in the retina of choroideremia mice and human cells *ex vivo*. *Journal of Molecular Medicine*. 2013;91:825-37. PMID: 3695676). Se generan y purifican preparaciones de vectores utilizando técnicas establecidas (Vandenberghe LH, Bell P, Maguire AM, Cearley CN, Xiao R, Calcedo R, Wang L, Castle MJ, Maguire AC, Grant R, Wolfe JH, Wilson JM, Bennett J. Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey. *Science translational medicine*. 2011;3:88ra54, Lock M, Alvira M, Vandenberghe LH, Samanta A, Toelen J, Debyser Z, Wilson JM. Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale. *Human Gene Therapy*. 2010;21:1259-71. PMID: 2957274). Se realiza la titulación mediante qPCR de Taqman con conjuntos de cebador-sonda dirigidos hacia la señal de poliadenilación en el genoma del vector.

Para estudiar la expresión de PRPF31 en células cultivadas, las células de ARPE-19 mutantes de PRPF31 y de control se cultivan en filtros de Transwell, tal como se describe en el Ejemplo 1. Se tratan células con la cantidad deseada de vectores de AAV-PRPF31 y se cultivan durante 11-14 días adicionales. Las células de RPE de tipo salvaje tratadas con AAV-PRPF31 y las células PRPF31<sup>+/+</sup> tratadas con AAV-EGFP se utilizan como controles. Los efectos del tratamiento de AAV-PRPF31 se evalúan utilizando varios enfoques. La producción de proteína de PRPF31 de longitud completa se evalúa mediante experimentos de microscopía de inmunofluorescencia y transferencia western 2-4 días después de la transducción (Liu Q, Zhou J, Daiger SP, Farber DB, Heckenlively JR, Smith JE, Sullivan LS, Zuo J,

Milam AH, Pierce EA. Identification and subcellular localization of the RP1 protein in human and mouse photoreceptors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2002;43:22-32; Liu Q, Zuo J, Pierce EA. The retinitis pigmentosa 1 protein is a photoreceptor microtubule-associated protein. *Journal Neuroscience*. 2004;24:6427-36; Falk MJ, Zhang Q, Nakamaru-Ogiso E, Kannabiran C, Fonseca-Kelly Z, Chakarova C, Audo I, Mackay DS, Zeitz C, Borman AD, Staniszewska M, Shukla R, Palavalli L, Mohand-Said S, Waseem NH, Jalali S, Perin JC, Place E, Ostrovsky J, Xiao R, Bhattacharya SS, Consugar M, Webster AR, Sahel JA, Moore AT, Berson EL, Liu Q, Gai X, Pierce EA. NMNAT1 mutations cause Leber congenital amaurosis. *Nature Genetics*. 2012;44:1040-5). La transferencia genética se somete a ensayo mediante 1PCR para genomas de vectores. La restauración de la actividad fagocítica normal de las células mutantes se mide mediante tratamiento con POR marcados con FITC, utilizando técnicas establecidas (Ejemplo 1, Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD, Rodriguez- Boulan E. Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *ProcNatlAcadSciUSA*. 1997;94:12932-7; Singh R, Shen W, Kuai D, Martin JM, Guo X, Smith MA, Perez ET, Phillips MJ, Simonett JM, Wallace KA, Verhoeven AD, Capowski EE, Zhang X, Yin Y, Halbach PJ, Fishman GA, Wright LS, Pattnaik BR, Gamm DM. iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Human Molecular Genetics*. 2013;22:593-607).

Para estudiar la expresión de PRPF31 y función en ratones mutantes de Prpf31<sup>+/-</sup>, se utiliza el suministro mediado por AAV de PRPF31 para tratar la fagocitosis defectiva en ratones Prpf31<sup>+/-</sup> *in vivo*. Para estos estudios, las dosis óptimas de los vectores de AAV-PRPF31 identificados en estudios de cultivo celular se inyecta de modo subretiniano en un ojo de ratón de Prpf31<sup>+/-</sup>. Los ojos se recogen 1 mes después de la inyección y se evalúan para su expresión y localización de la proteína de PRPF31 de longitud completa utilizando ensayos de inmunofluorescencia y transferencia western (Liu Q, Lyubarsky A, Skalet JH, Pugh EN, Jr., Pierce EA. RP1 is required for the correct stacking of outer segment discs. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003;44:4171-83; Liu Q, Saveliev A, Pierce EA. The severity of retinal degeneration in Rplh gene-targeted mice is dependent on genetic background. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2009;50:1566-74; Liu Q, Collin RW, Cremers FP, den Hollander AI, van den Born LI, Pierce EA. Expression of Wild-Type Rp1 Protein in Rp1 Knock-in Mice Rescues the Retinal Degeneration Phenotype. *PLoS One*. 2012;7:e43251).

La capacidad de PRPF31 suministrado por AAV de evitar y/o rescatar la pérdida de ritmicidad de la fagocitosis de RPE se evalúa a las 2 horas antes de la aparición de luz (-2), a la aparición de luz (0) y a las 2, 4 y 6 (+2, +4, +6) horas después de la aparición de luz utilizando técnicas establecidas para la tinción inmunofluorescente de rodopsina y detección de fagosomas emplazados en la capa de células de RPE (Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC. Loss of synchronized retinal phago- cytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *Journal Experimental Medicine*. 2004;200:1539-45; Nandrot EF, Finnemann SC. Lack of alphavbeta5 integrin receptor or its ligand MFG-E8: distinct effects on retinal function. *Ophthalmic Research*. 2008;40:120-3). Evaluamos las retinas tratadas para probar el rescate de fenotipos inicialmente al 1 mes y 2 meses después de la inyección de AAV-PRPF31 en estos animales. Para evaluar la evidencia de la prevención de la degeneración de RPE, se tratan ratones de 1 mes de edad y la ultraestructura del RPE se evalúa para su rescate fenotípico a los 5, 8 y 11 meses después de la inyección de AAV-PRPF31 (Graziotto JJ, Farkas MH, Bujakowska K, Deramautd BM, Zhang Q, Nandrot EF, Inglehearn CF, Bhattacharya SS, Pierce EA. Three gene-targeted mouse models of RNA splicing factor RP show late-onset RPE and retinal degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011;52:190-8). En base a los datos de portadores asintomáticos de mutaciones de PRPF31, prevemos que incluso un modesto aumento en el nivel de PRPF31 en las células de RPE tratadas resultará terapéutico (Rio FT, Wade NM, Ransijn A, Berson EL, Beckmann JS, Rivolta C. Premature termination codons in PRPF31 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *Journal Clinical Investigation*. 2008;118:1519-31; Vithana EN, Abu- Safieh L, Pelosini L, Winchester E, Hornan D, Bird AC, Hunt DM, Bustin SA, Bhattacharya SS. Expression of PRPF31 mRNA in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a molecular clue for incomplete penetrance? *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003;44:4204-9).

Ejemplo 5. Terapia de aumento génico mediada por AAV para mejorar el fenotipo de la fagocitosis defectiva en células de RPE cultivadas

Como se ha descrito anteriormente, hay buenas pruebas que las mutaciones en PRPF31 provocan enfermedad vía haploinsuficiencia y, de este modo, esta forma de RP dominante es susceptible de tratamiento con terapia de aumento génico (Wang et al., *American Journal Medical Genetics A*. 2003;121A:235-9; Xia et al., *Molecular Vision*. 2004;10:361-5; Abu-Safieh et al., *MolVis*. 2006;12:384-8; Rivolta et al., *Human Mutation*. 2006;27:644-53; Sullivan et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006;47:4579-88; Rio et al., *Human Mutation*. 2009;30:1340-7). Acorde con esta hipótesis, el nivel de expresión de PRPF31 del alelo de tipo salvaje se corresponde con la gravedad de la enfermedad en pacientes con mutaciones en el PRPF31 (Rio et al., *Journal Clinical Investigation*. 2008;118:1519-31; Venturini et al., *PLoS genetics*. 2012;8:e1003040; Rose et al., *Scientific reports*. 2016;6:19450). Para evaluar esta hipótesis, utilizamos terapia de aumento génico mediado por AAV para mejorar el fenotipo en células de RPE cultivadas.

Para estos estudios, generamos un vector viral AAV.CASI.PRPF31, y se demostró que este puede producir proteínas de PRPF31 de longitud completa en células cultivadas. La secuencia de este vector es la siguiente:

ES 2 806 054 T3

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCG  
CCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCC  
TTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGATCGGAAT

TCGGAGTTCGCGTACATAA CTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCG  
CCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTC  
AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGT  
ACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTT  
ATGGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGA  
GCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTAT  
TTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGGCG  
GGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGC  
CGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGGCCCTATAAAAAGCGAAGCG  
CGCGGCGGGCGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCCCGCCTCGCGC  
CGCCCCCGGCTCTGACTGACCGGCTTACTAAAACAGGTAAGTCCGGCTCCGCGCCGGTTT  
TGGCGCCTCCCGGGGCGCCCCCTCCTCACGGCGAGCGCTGCCACGTCAGACGAAGGGCGCAG  
CGAGCGTCTGATCCTTCCGCCCGACGCTCAGGACAGCGGCCCGCTGCTCATAAGACTCGGCCT  
TAGAACCCAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTCTAGGGCACTGGT  
TTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAGTCCCTTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGAT  
CTCCGTGGGGCGGTGAACGCCGATGATGCCCTACTAACCATGTTTCATGTTTTCTTTTTTTCTA  
CAGGTCTGGGTGACGAACAGGCTAGCGCCACCATGGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGG  
TCTCGATTCTACGGCCGCCACCATGTCTCTGGCAGATGAGCTCTTAGCTGATCTCGAAGAGGCGAG  
CAGAAGAGGAGGAAGGAGGAAGCTATGGGGAGGAAGAAGAGGAGCCAGCGATCGAGGATGTG  
CAGGAGGAGACACAGCTGGATCTTTCCGGGGATTCAAGTCAAGACCATCGCCAAGCTATGGGATA  
GTAAGATGTTGCTGAGATTATGATGAAGATTGAGGAGTATATCAGCAAGCAAGCCAAAGCTTC  
AGAAGTGATGGACACAGTGGAGGCCGCGCCTGAATACCGCGTCATCGTGGATGCCAACAACTG  
ACCGTGGAGATCGAAAACGAGCTGAACATCATCCATAAGTTCATCCGGGATAAGTACTCAAAGA  
GATTCCTGAACTGGAGTCTTGGTCCCCAATGCACTGGATTACATCCGCACGGTCAAGGAGCTG  
GGCAACAGCCTGGACAAGTGCAAGAACAATGAGAACCTGCAGCAGATCTCACCAATGCCACCA  
TCATGGTCGTCAGCGTACCGCTCCACCACCCAGGGGCGAGCAGCTGTCGGAGGAGGAGCTGGA  
GCGGCTGGAGGAGCCTGCGACATGGCGCTGGAGCTGAACGCCTCCAAGCACCGCATCTACGAG  
TATGTGGAGTCCCGGATGTCTTCATCGCACCCAACCTGTCCATCATTATCGGGGCATCCACGGC  
CGCCAAGATCATGGGTGTGGCCGGCGGCCTGACCAACCTCTCCAAGATGCCCGCTGCAACATCA  
TGCTGCTCGGGGCCAGCGCAAGACGCTGTGCGGGCTTCTCGTCTACCTCAGTGTGCCCCACACC  
GGCTACATCTACCACAGTGACATCGTGCAGTCCCTGCCACCGGATCTGCGGCGGAAAGCGGGCC  
GGCTGGTGGCCGCAAGTGACACTGGCAGCCGCTGTGGACAGTTTCCACGAGAGCACAGAAGG  
GAAGTGGGTACGAACTGAAGGATGAGATCGAGCGCAAATTCGACAAGTGGCAGGAGCCGCC  
GCCTGTGAAGCAGGTGAAGCCGCTGCCTGCGCCCTGGATGGACAGCGGAAGAAGCGAGGCGGG  
CGCAGGTACCGCAAGATGAAGGAGCGGCTGGGGCTGACGGAGATCCGGAAGCAGGCCAACCGT  
ATGAGCTTCGGAGAGATCGAGGAGGACGCTACCAGGAGGACCTGGGATTACGCTGGGCCACC  
TGGGCAAGTCGGGCGAGTGGGCGTGTGCGGCAGACACAGGTAACGAGGCCACCAAGGCCAGGA  
TCTCCAAGACGCTGCAGCGGACCCTGCAGAAGCAGAGCGTCTGATATGGCGGGAAGTCCACCAT  
CCGCGACCGCTCCTCGGGCACGGCCTCCAGCGTGGCCTTACCCCACTCCAGGGCCTGGAGATTG  
TGAACCCACAGGCGGCAGAGAAGAAGGTGGCTGAGGCCAACCAAGATATTTCTCCAGCATGGC  
TGAGTTCCTCAAGGTCAAGGGCGAGAAGAGTGGCCTTATGTCCACCTGAACCGGTTGGCTAATAA  
AGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATAT  
GGGAGGGCAAATCATTTAAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTTGGCAACATATGCCCA  
TATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTATATGAAACAGCCCCCTG  
CTGTCCATTCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGATTTTTTATATTTTGTTTTGT  
GTTATTTTTTTCTTTAACATCCCTAAAATTTTCTTACATGTTTTACTAGCCAGATTTTTCTCTCT  
CCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTCTTATGGAGATCGGATCCGAATTTCCGATAAG  
GATCTTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACATAAAGGAAC  
CCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCA  
AAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCCTTA  
ATTAACCTAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAA  
CTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA  
TCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGGCGCATTA  
GCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCCGT  
CCTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGG  
GGCTCCCTTTAGGTTCCGATTTAGTGCCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGT  
GATGGTTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGTTTTCGCCCCTTGACGTTGGAGTCCAC  
GTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTT  
TGATTTATAAGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAT  
TTAACCGGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTATAATTCAGGTGGCATCTTTCGGGGAAATGTG

CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA  
 CCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGC  
 CCTTATCCCTTTTTTTCGGCATTTCCTTCCTGTTTTTTCCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTA  
 AAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAATAGTGGTA  
 AGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTAT  
 GTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCT  
 CAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA  
 GAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACG  
 ATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCGCTTGA  
 TCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTA  
 GTAATGGTAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACA  
 ATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTG  
 GCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATGTCAGCACTG  
 GGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGG  
 ATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATGGTAACCTGTCAGA  
 CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGT  
 GAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTC  
 AGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTT  
 GCAAACAAAAAAACACCCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGCGATCAAGAGTACCAACTCTTT  
 TTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAG  
 TTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCA  
 GTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGA  
 TAAGGCGCAGCGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACC  
 TACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAA  
 AGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAG  
 GGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGTAGCGTCGATTTT  
 TGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTC  
 CTGGCCTTTTGTGCTGCGTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACC  
 GTATTACCGCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCAACGACCGAGCGCAGCGAGTC  
 AGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATT  
 CATTAAATGCAGCTGGCAGACAGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTA  
 ATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGT  
 GTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTT  
 AATTAAGG (SEQ ID NO:34)

5	ITR - pZac2.1 repetición de terminal invertida - Promotor - CASI Etiqueta - V5 Inserto - PRPF31 secuencia poliA - β-globina de conejo	nts 1-130 y 3291-3420 nts 197-1252 nts 1259-1309 nts 1319-2818 nts 2825-3211
---	---	--

10 A continuación sometimos a ensayo la capacidad del AAV.CASI.PRPF31 de corregir el fenotipo de la fagocitosis defectiva en células ARPE-19 deficientes de PRPF31 editadas de genomas. Para estos experimentos, se transdujeron células ARPE-19 mutantes de PRPF31 editadas de genoma (GE31) con AAV.CASI.PRPF31 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0, 10.000 y 15.000. Tras la transducción, se incubó cada réplica con segmentos externos de fotorreceptores marcados con FITC (FITC-POS) 1x10<sup>6</sup> durante 1 hora a 37 °C. Se determinó la captación de FITC-POS sometiendo a recuento las células positivas de FITC utilizando citometría de flujo. El tratamiento de la línea celular mutante de GE31 dio como resultado la captación de FITC-POS aumentada, en forma dosis-dependiente (Figura 7). Este resultado confirma el potencial de la terapia de aumento génico para ser utilizada para el tratamiento de la degeneración retiniana asociada a PRPF31.

20 OTRAS REALIZACIONES

Cabe entender que mientras que la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la anterior descripción está prevista para ilustrar y no limitar el alcance de la invención, la cual queda definida por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones entran dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

25 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Massachusetts Eye and Ear Infirmary

<120> TERAPIAS DE AUMENTO GÉNICO PARA  
LA DEGENERACIÓN RETINAL HEREDADA PROVOCADA POR MUTACIONES EN EL

5 GEN PRPF31  
<130> 00633-0192WO1

<150> US 62/147,307  
<151> 2015-04-14

10 <150> US 62/129,638  
<151> 06/03/2015

<160> 34

15 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
<211> 736  
<212> PRT

20 <213> Virus adeno-asociado

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (168)..(168)

25 <223> /replace="Arg"

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (204)..(204)

30 <223> /replace="Ser"

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (266)..(266)

35 <223> /replace="Gly"

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (311)..(311)

40 <223> /replace="Lys"

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (411)..(411)

45 <223> /replace="Gln"

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (460)..(460)

50 <223> /replace="Glu"

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (493)..(493)

55 <223> /replace="Thr"

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (562)..(562)

60 <223> /replace="Asn"

<220>  
<221> VARIANTE  
<222> (576)..(576)

65 <223> /replace="Glu"

ES 2 806 054 T3

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (587)..(587)  
 5 <223> /replace="Ala"  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (609)..(609)  
 10 <223> /replace="Asp"  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(736)  
 15 <223> /nota="Los restos de variante proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variante"  
 <400> 1

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



ES 2 806 054 T3

Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu 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 Ser Arg  
435 440 445

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu 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 His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu  
625 630 635 640

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

ES 2 806 054 T3

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

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

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

Tyr Asn Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala 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

5 <210> 2  
<211> 2208  
<212> ADN  
<213> Virus adeno-asociado

10 <220>  
<221> variación  
<222> (502)..(504)  
<223> /replace="aaa"

15 <220>  
<221> variación  
<222> (610)..(612)  
<223> /replace="agc"

20 <220>  
<221> variación  
<222> (796)..(798)  
<223> /replace="ggc"

25 <220>  
<221> variación  
<222> (931)..(933)  
<223> /replace="aag"

30 <220>  
<221> variación  
<222> (1231)..(1233)  
<223> /replace="cag"

35 <220>  
<221> variación  
<222> (1378)..(1380)  
<223> /replace="gag"

40 <220>  
<221> variación  
<222> (1477)..(1479)  
<223> /replace="acc"

45 <220>  
<221> variación  
<222> (1684)..(1686)

ES 2 806 054 T3

<223> /replace="aac"  
 <220>  
 <221> variación  
 5 <222> (1726)..(1728)  
 <223> /replace="gag"  
 <220>  
 <221> variación  
 10 <222> (1759)..(1761)  
 <223> /replace="gcc"  
 <220>  
 <221> variación  
 15 <222> (1825)..(1827)  
 <223> /replace="gac"  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 20 <222> (1)..(2208)  
 <223> /nota="Los nucleótidos de variación proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variación"  
 <400> 2  
 25

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc	60
gagtgggagg acttgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaagcaggac	120
gacggccggg gtctgggtgct tcctggctac aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac	180
aagggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca ggggccctcg agcacgacaa ggcctacgac	240
cagcagctca aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata accacgccga cgccgagttt	300
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag	360
gccaagaagc gggttctcga acctctcggg ctgggtgagg aaggcgctaa gacggctcct	420
ggaaagaaga gaccggtaga gcaatcaacc caggaaccag actcctcttc gggcatcggc	480
aagaaaggcc agcagccccg gaagaagaga ctcaactttg ggacagacag cgactcagag	540
tcagtgcccg accctcaacc actcggagaa cccccgcag cccctctgg tgtgggatct	600
aatacaatgg cagcaggcgg tggcgctcca atggcagaca ataacgaagg cgccgacgga	660
gtgggtaacg cctcaggaaa ttggcattgc gattccacat ggctgggcga cagagtcac	720
accaccagca cccgaacctg ggcctcccc acctacaaca accacctcta caagcaaatac	780
tccagccaat cgggagcaag caccaacgac aacacctact tcggctacag cccccctgg	840
gggtattttg actttaaagc attccactgc cacttctcac cacgtgactg gcagcgactc	900
atcaacaaca actggggatt ccggcccaag agactcaact tcaagctctt caacatccag	960
gtcaaggagg tcacgacgaa tgatggcacc acgacctcg ccaataacct taccagcagc	1020
gttcaggtct ttacggactc ggaataaccag ctcccgtacg tcctcggctc tgcgcaccag	1080

ES 2 806 054 T3

ggctgcctgc ctccgttccc ggcggacgtc ttcattgatc ctcagtacgg gtacctgact 1140  
 ctgaacaatg gcagtcaggc cgtgggcoct tcctccttct actgcctgga gtactttcct 1200  
 tctcaaatgc tgagaacggg caacaacttt gagttcagct acacgtttga ggacgtgcct 1260  
 tttcacagca gctacgcgca cagccaaagc ctggaccggc tgatgaaccc cctcatcgac 1320  
 cagtacctgt actacctgtc tcggactcag accacgagtg gtaccgcagg aaatcggacg 1380  
 ttgcaatfff ctcaggccgg gcctagtagc atggcgaatc aggccaaaaa ctggctaccc 1440  
 gggccctgct accggcagca acgctctcc aagacagcga atcaaaataa caacagcaac 1500  
 tttgcctgga ccggtgccac caagtatcat ctgaatggca gagactctct ggtaaattccc 1560  
 ggtcccgcta tggcaaccca caaggacgac gaagacaaat tttttccgat gagcggagtc 1620  
 ttaatatfff ggaaacaggg agctggaaat agcaacgtgg accttgacaa cgttatgata 1680  
 accagtgagg aagaaattaa aaccaccaac ccagtggcca cagaacagta cggcacggtg 1740  
 gccactaacc tgcaatcgtc aaacaccgct cctgctacag ggaccgtcaa cagtcaagga 1800  
 gccttacctg gcatggctg gcagaaccgg gacgtgtacc tgcagggtcc tatctgggcc 1860  
 aagattcctc acacggacgg aactttcat cctcgcgcg tgatgggagg ctttggactg 1920  
 aaacaccgct ctcctcagat cctgattaag aatacacctg ttcccgcgaa tcctccaact 1980  
 accttcagtc cagctaagtt tgcgtcgttc atcacgcagt acagcaccgg acaggtcagc 2040  
 gtggaaattg aatgggagct gcagaaagaa aacagcaaac gctggaaccc agagattcaa 2100  
 tacacttcca actacaacaa atctacaaat gtggactttg ctgttgacac aaatggcggt 2160  
 tattctgagc ctcgccccat cggcaccogt tacctcacc gtaatctg 2208

5 <210> 3  
 <211> 737  
 <212> PRT  
 <213> Virus adeno-asociado

10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (157)..(157)  
 <223> /replace="Ser"

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (168)..(168)  
 <223> /replace="Arg"

20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (262)..(262)  
 <223> /replace="Ser"

25 <220>  
 <221> VARIANTE

<222> (263)..(263)  
 <223> /replace="His"

5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (312)..(312)  
 <223> /replace="Lys"

10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (412)..(412)  
 <223> /replace="Gln"

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (460)..(460)  
 <223> /replace="Gln"

20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (461)..(461)  
 <223> /replace="Glu"

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (552)..(552)  
 <223> /replace="Ser"

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (556)..(556)  
 <223> /replace="Tyr"

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (557)..(557)  
 <223> /replace="Ser"

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (563)..(563)  
 <223> /replace="Asn"

45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (580)..(580)  
 <223> /replace="Ile"

50 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (588)..(588)  
 <223> /replace="Ser"

55 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (664)..(664)  
 <223> /replace="Thr"

60 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(737)  
 <223> /nota="Los restos de variante proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variante"

65 <400> 3

ES 2 806 054 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Lys 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 Val Gly Ser Asn Thr Met Ala Ala 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

ES 2 806 054 T3

				245						250					255
Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Asn	Ser	Gln	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	Asp	Gly	Thr	Thr	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	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asn
	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	Glu	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	Ser
		435					440					445			
Arg	Thr	Gln	Thr	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Gln	Phe
	450					455					460				
Ser	Gln	Ala	Gly	Pro	Ser	Ser	Met	Ala	Asn	Gln	Ala	Lys	Asn	Trp	Leu
465					470					475					480
Pro	Gly	Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Lys	Thr	Thr	Asn	Gln
				485					490					495	

ES 2 806 054 T3

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

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

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

Gly Lys Gln Gly Ala Gly Asn Asp Asn Val Asp Leu Asp Asn Val Met  
 545 550 555 560

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu

<210> 4  
 <211> 2211  
 <212> ADN  
 <213> Virus adeno-asociado  
 5  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (469)..(471)  
 <223> /replace="agc"  
 10  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (502)..(504)  
 <223> /replace="aag"  
 15  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (784)..(786)  
 <223> /replace="agt"  
 20  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (787)..(789)  
 <223> /replace="cac"  
 25  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (934)..(936)  
 <223> /replace="aag"  
 30  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1234)..(1236)  
 <223> /replace="cag"  
 35  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1378)..(1380)  
 <223> /replace="cag"  
 40  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1381)..(1383)  
 <223> /replace="gag"  
 45  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1654)..(1656)  
 <223> /replace="agc"  
 50  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1666)..(1668)  
 <223> /replace="tac"  
 55  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1669)..(1671)  
 60  
 <223> /replace="agc"  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1687)..(1689)  
 <223> /replace="aac"  
 65

ES 2 806 054 T3

5 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1738)..(1740)  
 <223> /replace="atc"

10 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1762)..(1764)  
 <223> /replace="agc"

15 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1990)..(1992)  
 <223> /replace="acc"

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2211)  
 <223> /nota="Los nucleótidos de variación proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variación"

<400> 4

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc	60
gagtgggtggg acttgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaagcaggac	120
gacggccggg gtctggtgct tcctggctac aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac	180
aagggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac	240
cagcagctca aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata accacgccga cgccgagttt	300
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag	360
gccaaagaagc gggttctcga acctctcggg ctggttgagg aaggcgctaa gacggctcct	420
ggaaagaaga gaccggtaga gcaatcacc caggaaccag actcctctac gggcatcggc	480
aagaaaggcc agcagccgc gaaaaagaga ctcaacttg ggcagactgg cgactcagag	540
tcagtgcccg accctcaacc actcggagaa cccccgcag cccctctgg tgtgggatct	600
aatacaatgg ctgcaggcgg tggcgctcca atggcagaca ataacgaagg cgccgacgga	660
gtgggtaatg cctcaggaaa ttggcattgc gattccacat ggctgggcga cagagtcac	720
accaccagca cccgaacctg ggcctcccc acctacaaca accacctcta caagcaaadc	780
tccaacagcc aatcgggagg aagcaccaac gacaacacct acttcggcta cagcaccccc	840
tgggggtatt ttgactttaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga	900
ctcatcaaca acaactgggg attccggccc aagagactca acttcaagct cttcaacatc	960
caggtcaagg aggtcacgac gaatgatggc accacgacca tcgccaataa ccttaccagc	1020
acggttcagg tctttacgga ctcggaatac cagctcccg acgtcctcgg ctctgcgcac	1080

ES 2 806 054 T3

cagggctgcc tgcoctcogtt cccggcggac gtcttcatga ttcoctcagta cgggtacctg 1140  
actctgaaca atggcagtca ggccgtgggc cgttcctcct tctactgcct ggagtacttt 1200  
ccttctcaaa tgctgagaac gggcaacaac tttgagttca gctacacgtt tgaggacgtg 1260  
ccttttcaca gcagctacgc gcacagccaa agcctggacc ggctgatgaa cccctcatc 1320  
gaccagtacc tgtactacct gtctcggact cagaccacgg gaggtaccgc aggaaatcgg 1380  
acgttgcaat tttctcaggc cgggcctagt agcatggcga atcaggccaa aaactggcta 1440  
cccgggccct gctaccggca gcaacgcgtc tccaagacaa cgaatcaaaa taacaacagc 1500  
aaacttgccct ggaccgggtgc caccaagtat catctgaatg gcagagactc tctggtaaata 1560  
cccgggtgctg ctatggcaac ccacaaggac gacgaagacc gattttttcc gtccagcggg 1620  
gtcttaatat ttgggaaaca gggagctgga aatgacaacg tggaccttga caacgttatg 1680  
ataaccagtg aggaagaaat taaaaccacc aaccctcagg ccacagaaga gtacggcgtg 1740  
gtggccacta acctgcaatc ggcaaacacc gtcctcaaa cagggaccgt caacagtcaa 1800  
ggagccttac ctggcatggt ctggcagaac cgggacgtgt acctgcaggg tcctatctgg 1860  
gccaaagattc ctcacacgga cggaaacttt catccctcgc cgctgatggg aggctttgga 1920  
ctgaaacacc cgcctcctca gatcctgatt aagaatacac ctgttcccgc gaatcctcca 1980  
actaccttca gtccagctaa gtttgcgtcg ttcatcacgc agtacagcac cggacaggtc 2040  
agcgtggaaa ttgaatggga gctgcagaaa gaaaacagca aacgctggaa cccagagatt 2100  
caatacactt ccaactacaa caaatctaca aatgtggact ttgctgttga cacagaaggc 2160  
gtttattctg agcctcggcc catcggcacc cgttacctca cccgtaatct g 2211

- 5 <210> 5
- <211> 738
- <212> PRT
- <213> Virus adeno-asociado
  
- 10 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (158)..(158)
- <223> /replace="Ser"
  
- 15 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (169)..(169)
- <223> /replace="Arg"
  
- 20 <220>
- <221> VARIANTE
- <222> (564)..(564)
- <223> /replace="Asn"
  
- 25 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1)..(738)
- <223> /nota="Los restos de variante proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos"

ES 2 806 054 T3

en las anotaciones para las posiciones de variante"

<400> 5

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

ES 2 806 054 T3

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

Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly 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  
305 310 315 320

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

Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val 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 Ser Tyr  
405 410 415

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

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

Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Thr Leu Gln  
450 455 460

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

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Asn

ES 2 806 054 T3

				485					490					495			
Gln	Asn	Asn	Asn	Ser	Asn	Phe	Ala	Trp	Thr	Gly	Ala	Thr	Lys	Tyr	His		
			500					505					510				
Leu	Asn	Gly	Arg	Asp	Ser	Leu	Val	Asn	Pro	Gly	Val	Ala	Met	Ala	Thr		
		515					520					525					
His	Lys	Asp	Asp	Glu	Asp	Arg	Phe	Phe	Pro	Ser	Ser	Gly	Val	Leu	Ile		
	530					535					540						
Phe	Gly	Lys	Gln	Gly	Ala	Gly	Asn	Asp	Asn	Val	Asp	Tyr	Ser	Asn	Val		
545					550					555					560		
Met	Ile	Thr	Ser	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr		
				565					570					575			
Glu	Glu	Tyr	Gly	Val	Val	Ala	Thr	Asn	Leu	Gln	Ser	Ala	Asn	Thr	Ala		
			580					585					590				
Pro	Gln	Thr	Gly	Thr	Val	Asn	Ser	Gln	Gly	Ala	Leu	Pro	Gly	Met	Val		
		595					600						605				
Trp	Gln	Asn	Arg	Asp	Val	Tyr	Leu	Gln	Gly	Pro	Ile	Trp	Ala	Lys	Ile		
	610					615					620						
Pro	His	Thr	Asp	Gly	Asn	Phe	His	Pro	Ser	Pro	Leu	Met	Gly	Gly	Phe		
625					630					635					640		
Gly	Leu	Lys	His	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile	Lys	Asn	Thr	Pro	Val		
				645					650					655			
Pro	Ala	Asp	Pro	Pro	Thr	Thr	Phe	Asn	Gln	Ala	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	Asn	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			

ES 2 806 054 T3

Asn Leu

<210> 6  
 <211> 2214  
 <212> ADN  
 5 <213> Virus adeno-asociado  
  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (472)..(474)  
 10 <223> /replace="agc"  
  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (505)..(507)  
 15 <223> /replace="aga"  
  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1690)..(1692)  
 20 <223> /replace="aac"  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2214)  
 25 <223> /nota="Los nucleótidos de variación proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variación"  
  
 <400> 6  
  
 atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc 60  
 gagtgggtggg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaagcaggac 120  
 gacggccggg gtctgggtgct tcctggctac aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac 180  
 aaggggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240  
 cagcagctca aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata atcacgccga cgccgagttt 300  
 caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag 360  
 gccaaagaagc gggttctcga acctctcggg ctggttgagg aaggcgctaa gacggctcct 420  
 ggaaagaaga gaccggtaga gcagtcacca cagcgtgagc ccgactcctc cacgggcatc 480  
 ggcaagaaag gccagcagcc cgccaaaag agactcaatt tcggtcagac tggcgactca 540  
 gagtcagtcc ccgaccctca acctctcggg gaacctccag cagcgcctc tgggtgtggga 600  
 tctaatacaa tggctgcagg cgggtggcgca ccaatggcag acaataacga aggtgccgac 660  
 ggagtgggta attcctcggg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc 720  
 atcaccacca gcacccgaac ctgggcccctg cccacctaca acaaccacct ctacaagcaa 780  
 atctccaacg ggacctcggg aggcagcacc aacgacaaca cctactttgg ctacagcacc 840  
 30 ccctgggggt attttgactt taacagattc cactgccact tctcaccacg tgactggcag 900

ES 2 806 054 T3

cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagagac tcaacttcaa gctcttcaac 960  
atccagggtca aagagggtcac gacgaatgaa ggcaccaaga ccatcgcaa taacctcacc 1020  
agcaccgtcc aggtgtttac ggactcggaa taccagctgc cgtacgtcct cggtctgtcc 1080  
caccagggct gcctgcctcc gttcccggcg gacgtcttca tgattcctca gtacggctac 1140  
ctgactctca acaacggtag tcaggccgtg ggacgttctt ccttctactg cctggagtac 1200  
ttcccctctc agatgctgag aacgggcaac aactttcaat tcagctacac tttcgaggac 1260  
gtgcctttcc acagcageta cgcgcacagc cagagtttgg acaggctgat gaatcctctc 1320  
atcgaccagt acctgtacta cctgtcaaga acccagacta cgggaggcac agcgggaacc 1380  
cagacgttgc agttttctca ggccgggcct agcagcatgg cgaatcaggc caaaaactgg 1440  
ctgcctggac cctgctacag acagcagcgc gtctccacga caacgaatca aaacaacaac 1500  
agcaactttg cctggactgg tgccaccaag tatcatctga acggcagaga ctctctgggtg 1560  
aatccggggcg tcgccatggc aaccacaag gacgacgagg accgcttctt cccatccagc 1620  
ggcgtcctca tatttgcaa gcagggagct ggaaatgaca acgtggacta tagcaacgtg 1680  
atgataacca gcgaggaaga aatcaagacc accaaccctg tggccacaga agagtatggc 1740  
gtggtggcta ctaacctaca gtcggcaaac accgctcctc aaacggggac cgtcaacagc 1800  
cagggagcct tacctggcat ggtctggcag aaccgggacg tgtacctgca gggctctatt 1860  
tgggccaaga ttctcacac agatggcaac tttcaccctg ctctttaa gggcggcttt 1920  
ggacttaaac atccgcctcc tcagatcctc atcaaaaaca ctctgttcc tgcggatcct 1980  
ccaacaacgt tcaaccaggc caagctgaat tctttcatca cgcagtacag caccggacaa 2040  
gtcagcgtgg agatcgagtg ggagctgcag aaggagaaca gcaagcgtg gaaccagag 2100  
attcagtata cttccaacta ctacaaatct acaaagtgg actttgctgt taatactgag 2160  
ggtgtttact ctgagcctcg cccattggc actcgttacc tcaccgtaa tctg 2214

5 <210> 7  
<211> 738  
<212> PRT  
<213> Virus adeno-asociado

10 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (158)..(158)  
<223> /replace="Ser"

15 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (169)..(169)  
<223> /replace="Lys"

20 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (315)..(315)

ES 2 806 054 T3

<223> /replace="Ser"  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 5 <222> (413)..(413)  
 <223> /replace="Glu"  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 10 <222> (472)..(472)  
 <223> /replace="Thr" o "Ser"  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 15 <222> (534)..(534)  
 <223> /replace="Glu"  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 20 <222> (542)..(542)  
 <223> /replace="Val"  
 <220>  
 <221> VARIANTE  
 25 <222> (595)..(595)  
 <223> /replace="Val"  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 30 <222> (1)..(738)  
 <223> /nota="Los restos de variante proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variante"  
 <400> 7

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

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

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

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

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

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

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

35

ES 2 806 054 T3

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

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

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Arg Glu 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 Ser 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 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  
 305 310 315 320

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

ES 2 806 054 T3

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 Ser Tyr  
 405 410 415

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

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

Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Thr Leu Gln  
 450 455 460

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

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Ser  
 485 490 495

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 806 054 T3

610		615		620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe				
625		630		635
				640
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val				
		645		650
				655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala 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 Asn 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> 8
- <211> 2214
- <212> ADN
- <213> Virus adeno-asociado
  
- 10 <220>
- <221> variación
- <222> (472)..(474)
- <223> /replace="agc"
  
- 15 <220>
- <221> variación
- <222> (505)..(507)
- <223> /replace="aag"
  
- 20 <220>
- <221> variación
- <222> (943)..(945)
- <223> /replace="agc"
  
- 25 <220>
- <221> variación
- <222> (1237)..(1239)
- <223> /replace="gaa"
  
- 30 <220>
- <221> variación
  
- <222> (1414)..(1416)
- <223> /replace="aac" o "agc"
- 35

ES 2 806 054 T3

5  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1600)..(1602)  
 <223> /replace="gag"

10  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1624)..(1626)  
 <223> /replace="gtc"

15  
 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1783)..(1785)  
 <223> /replace="gta"

20  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2214)  
 <223> /nota="Los nucleótidos de variación proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variación"

<400> 8

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc	60
gagtggtggg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaagcaggac	120
gacggccggg gtctggtgct tcctggctac aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac	180
aaggggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcggccctcg agcacgaca ggcctacgac	240
cagcagctca aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata atcacgccga cgccgagttt	300
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag	360
gccaagaagc gggttctcga acctctcggg ctgggtgagg aaggcgctaa gacggctcct	420
ggaaagaaga gaccggtaga gcagtcacca cagcgtgagc ccgactcctc cacgggcatc	480
ggcaagaaag gccagcagcc cgccagaaag agactcaatt tcggtcagac tggcgactca	540
gagtcagtc ccgacctca acctctcgga gaacctccag cagcgcctc tgggtgggga	600
tctaatacaa tggtgcagg cggtggcgca ccaatggcag acaataacga aggtgccgac	660
ggagtgggta gttcctcggg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc	720
atcaccacca gcacctgaac ctgggacctg cccacctaca acaaccacct ctacaagcaa	780
atctccaacg ggacctcggg aggcagcacc aacgacaaca cctactttgg ctacagcacc	840
ccctgggggt attttgactt taacagattc cactgccact tctcaccag tgactggcag	900
cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagagac tcaacttcaa gctcttcaac	960
atccaggtca aagaggtcac gcagaatgaa ggcaccaaga ccatcgccaa taacctcacc	1020
agcaccatcc aggtgtttac ggactcggaa taccagctgc cgtacgtcct cggctctgcc	1080
caccagggct gcctgcctcc gttcccggcg gacgtcttca tgattcctca gtacggctac	1140

ES 2 806 054 T3

```

ctgactctca acaacggtag tcaggccgtg ggacgttctt ctttctactg cctggagtac      1200
ttcccctctc agatgctgag aacgggcaac aactttcaat tcagctacac tttcgaggac      1260
gtgcctttcc acagcagcta cgcgcacagc cagagtttgg acaggctgat gaatcctctc      1320
atcgaccagt acctgtacta cctgtcaaga acccagacta cgggaggcac agcgggaacc      1380
cagacgttgc agttttctca ggccgggcct agcaacatgg cgaatcagge caaaaactgg      1440
ctgcctggac cctgctacag acagcagcgc gtctccacga caacgtcgca aaacaacaac      1500
agcaactttg cctggactgg tgccaccaag tatcatctga acggcagaga ctctctggtg      1560
aatccgggcg tcgccatggc aaccacaag gacgacgagg accgcttctt cccatccagc      1620
ggcatcctca tatttgcaa gcagggagct ggaaaagaca acgtggacta tagcaacgtg      1680
atgctaacca gcgaggaaga aatcaagacc accaaccctg tggccacaga agagtatggc      1740
gtggtggctg ataacctaca gcagcaaac accgctctct aaataggagc cgtcaacagc      1800
cagggagcct tacctggcat ggtctggcag aaccgggacg tgtacctgca gggctctatt      1860
tgggccaaga ttctcacac agatggcaac tttcaccctg ctctttaa tggcggcttt      1920
ggacttaaac atccgcctcc tcagatctct atcaaaaaca ctctgttcc tgcggatcct      1980
ccaacaacgt tcaaccaggc caagctgaat tctttcatca cgcagtacag caccggacaa      2040
gtcagcgtgg agatcgagtg ggagctgcag aaggagaaca gcaagcgctg gaaccagag      2100
atcagttata cttccaacta ctacaaatct acaaatgtgg actttgctgt taatactgag      2160
ggtgtttact ctgagcctcg cccattggc actcgttacc tcaccgtaa tctg          2214

```

5 <210> 9  
 <211> 738  
 <212> PRT  
 <213> Virus adeno-asociado

10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (169)..(169)  
 <223> /replace="Lys"

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (315)..(315)  
 <223> /replace="Ser"

20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (534)..(534)  
 <223> /replace="Glu"

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (542)..(542)  
 <223> /replace="Val"

30 <220>  
 <221> misc\_feature

ES 2 806 054 T3

<222> (1)..(738)

<223> /nota="Los restos de variante proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variante"

5 <400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Val Glu 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 Ile Gly Glu Pro  
180 185 190

Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val 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

ES 2 806 054 T3

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

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

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

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

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  
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu  
 450 455 460

Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp



ES 2 806 054 T3

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

Asn Leu

5 <210> 10  
 <211> 2214  
 <212> ADN  
 <213> Virus adeno-asociado

10 <220>  
 <221> variación  
 <222> (505)..(507)  
 <223> /replace="aaa"

15 <220>  
 <221> variación  
 <222> (943)..(945)  
 <223> /replace="agc"

20 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1600)..(1602)  
 <223> /replace="gag"

25 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1624)..(1626)  
 <223> /replace="gtc"

30 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2214)  
 <223> /nota="Los nucleótidos de variación proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variación"

35 <400> 10

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc 60  
 gagtggtagg acctgaaacc tggagccccg aaaccctaaag ccaaccagca aaagcaggac 120  
 gacggccggg gtctgggtgct tcctgggtac aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac 180  
 aagggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcggccctcg agcacgaca ggcctacgac 240  
 cagcagctca aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata atcacgccga cgccgagttt 300  
 caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggagagc agtcttccag 360  
 gccaagaagc gggttctcga acctctcggg ctgggtgagg aaggcgctaa gacggctcct 420  
 ggaaagaaga gaccggtaga gccgtacca cagcgttccc ccgactcctc cacgggcatc 480  
 ggcaagaaag gccagcagcc cgccagaaag agactcaatt tcggtcagac tggcgactca 540  
 gagtcatgcc ccgaccctca acctatcgga gaacctccag cagcgcctc tgggtgtggga 600  
 tctgggtacaa tggctgcagg cggtgccgca ccaatggcag acaataacga aggtgccgac 660

ES 2 806 054 T3

ggagtgggta gttcctcggg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc 720  
 atcaccacca gcacccgaac ctgggccctg cccacctaca acaaccacct ctacaagcaa 780  
 atctccaacg ggacctcggg aggcagcacc aacgacaaca cctactttgg ctacagcacc 840  
 ccctgggggt attttgactt taacagattc cactgccact tctcaccacg tgactggcag 900  
 cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagagac tcaacttcaa gctcttcaac 960  
 atccaggtca aagaggtcac gcagaatgaa ggcaccaaga ccatcgcaa taacctcacc 1020  
 agcaccatcc aggtgtttac ggactcggaa taccagctgc cgtacgtcct cggtctctgcc 1080  
 caccagggct gcctgcctcc gttcccggcg gacgtcttca tgattcctca gtacggctac 1140  
 ctgactctca acaacggtag tcagggcgtg ggacgttctt ccttctactg cctggagtac 1200  
 ttcccctctc agatgctgag aacgggcaac aactttgagt tcagctacac tttcaggagc 1260  
 gtgcctttcc acagcagcta cgcgcacagc cagagtttgg acaggctgat gaatcctctc 1320  
 atcgaccagt acctgtacta cctgtcaaga acccagtcta cgggaggcac agcgggaacc 1380  
 cagcagttgc tgttttctca ggccgggcct agcaacatgt cggctcaggc caaaaactgg 1440  
 ctgcctggac cctgctacag acagcagcgc gtctccacga cactgtcgcg aaacaacaac 1500  
 agcaactttg cctggactgg tgccaccaag tatcatctga acggcagaga ctctctggtg 1560  
 aatccgggcg togccatggc aaccacaag gacgacgagg accgcttctt cccatccagc 1620  
 ggcatcctca tgtttggcaa gcagggagct ggaaaagaca acgtggacta tagcaacgtg 1680  
 atgctaacca gcgaggaaga aatcaagacc accaaccctg tggccacaga acagtatggc 1740  
 gtggtggctg ataacctaca gcagcaaac accgctccta ttgtgggggc cgtcaacagc 1800  
 cagggagcct tacctggcat ggtctggcag aaccgggacg tgtacctgca gggctctatt 1860  
 tgggccaaga ttctctcacac agatggcaac tttcaccctg ctctttaa gggcggcttt 1920  
 ggacttaaac atccgcctcc tcagatcctc atcaaaaaca ctctgttcc tgcggatcct 1980  
 ccaacaacgt tcaaccaggc caagctgaat tctttcatca cgcagtacag caccggacaa 2040  
 gtcagcgtgg agatcgagtg ggagctgcag aaggagaaca gcaagcgtg gaaccagag 2100  
 attcagtata cttccaacta ctacaaatct acaaatgtgg actttgctgt taatactgag 2160  
 ggtgtttact ctgagcctcg cccattggc actcgttacc tcaccgtaa tctg 2214

<210> 11  
 <211> 738  
 <212> PRT  
 <213> Virus adeno-asociado

5

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (471)..(471)  
 <223> /replace="Asn"

10

<220>

ES 2 806 054 T3

<221> misc\_feature

<222> (1)..(738)

<223> /nota="Los restos de variante proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variante"

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gly 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

ES 2 806 054 T3

210						215										220
Ser	Ser	Gly	Asn	Trp	His	Cys	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu	Gly	Asp	Arg	Val	
225					230					235					240	
Ile	Thr	Thr	Ser	Thr	Arg	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro	Thr	Tyr	Asn	Asn	His	
				245					250					255		
Leu	Tyr	Lys	Gln	Ile	Ser	Asn	Gly	Thr	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Asp	
			260					265						270		
Asn	Thr	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe	Asn	
		275					280						285			
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					320	
Ile	Gln	Val	Lys	Glu	Val	Thr	Gln	Asn	Glu	Gly	Thr	Lys	Thr	Ile	Ala	
				325					330					335		
Asn	Asn	Leu	Thr	Ser	Thr	Ile	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln	
			340					345					350			
Leu	Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Gln	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	
		355					360						365			
Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	
	370					375					380					
Asn	Gly	Ser	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	
385					390					395					400	
Phe	Pro	Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Glu	Phe	Ser	Tyr	
				405					410					415		
Thr	Phe	Glu	Asp	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	
			420					425					430			
Leu	Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	
		435					440					445				
Ser	Arg	Thr	Gln	Ser	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Gly	Thr	Gln	Gln	Leu	Leu	
	450					455						460				

ES 2 806 054 T3

Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp  
 465 470 475 480  
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser  
 485 490 495  
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His  
 500 505 510 515  
 Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr  
 515 520 525  
 His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met  
 530 535 540  
 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 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 Gln Asn Thr 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 Glu  
 705 710 715 720

ES 2 806 054 T3

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

Asn Leu

5 <210> 12  
 <211> 2214  
 <212> ADN  
 <213> Virus adeno-asociado

10 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1411)..(1413)  
 <223> /replace="aat"

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2214)  
 <223> /nota="Los nucleótidos de variación proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variación"

20 <400> 12

```

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc      60
gagtgggtggg acttgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaagcaggac      120
gacggccggg gtctgggtgct tcctggctac aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac      180
aaggggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac      240
cagcagctca aagcgggtga caatccgtac ctgctgtata accacgccga cgccgagttt      300
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag      360
gccaaagaagc gggttctoga acctctcggg ctggttgagg aaggcgctaa gacggctcct      420
ggaaagaaga gaccggtaga gccatcacc cagcgttctc cagactcctc tacgggcatc      480
ggcaagaaag gccagcagcc cgcgaaaaag agactcaact ttgggcagac tggcgactca      540
gagtcaagtgc ccgacctca accaatcgga gaaccccccg caggccccctc tggctctggga      600
tctggtacaa tggctgcagg cgggtggcgct ccaatggcag acaataacga aggcgcccag      660
ggagtgggta gttcctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc      720
atcaccacca gcacccgaac ctgggcccctc cccacctaca acaaccacct ctacaagcaa      780
atctccaacg ggacttcggg aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc      840
ccctgggggt attttgactt taacagattc cactgccact tctcaccacg tgactggcag      900
cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagagac tcaacttcaa gctcttcaac      960
atccaggtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccaaga ccatcgccaa taaccttacc     1020
agcacgattc aggtctttac ggactcggaa taccagctcc cgtacgtcct cggctctgcg     1080
    
```

ES 2 806 054 T3

caccagggct gcctgcctcc gttcccggcg gacgtcttca tgattcctca gtacgggtac 1140  
ctgactctga acaatggcag tcaggccgtg ggccgttccct ccttctactg cctggagtac 1200  
tttccttctc aaatgctgag aacgggcaac aactttgagt tcagctacac gtttgaggac 1260  
gtgccttttc acagcagcta cgcgcacagc caaagcctgg accggctgat gaaccccctc 1320  
atcgaccagt acctgtacta cctgtctcgg actcagtcca cgggaggtac cgcaggaact 1380  
cagcagttgc tattttctca ggccgggcct agtaacatgt cggctcaggc caaaaactgg 1440  
ctaccggggc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca aaataacaac 1500  
agcaactttg cctggaccgg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctggta 1560  
aatcccgggtg tcgctatggc aaccacaag gacgacgaag agcgatTTTT tccgtccagc 1620  
ggagtcttaa tgtttgggaa acagggagct ggaaaagaca acgtggacta tagcagcgtt 1680  
atgctaacca gtgaggaaga aattaaacc accaaccagc tggccacaga acagtacggc 1740  
gtggtggccg ataacctgca acagcaaac accgctccta ttgtaggggc cgtcaacagt 1800  
caaggagcct tacctggcat ggtctggcag aaccgggacg tgtacctgca gggctctatc 1860  
tgggccaaga ttcctcacac ggacggaac tttcatccct cgcogctgat gggaggcttt 1920  
ggactgaaac accgcctcc tcagatcctg attaagaata cacctgttcc cgcggatcct 1980  
ccaactacct tcagtcaagc taagctggcg tcgttcatca cgcagtacag caccggacag 2040  
gtcagcgtgg aaattgaatg ggagctgacg aaagaaaaca gcaaacgctg gaaccagag 2100  
attcaataca cttccaacta ctacaaatct acaaagtgg actttgctgt taacacagaa 2160  
ggcacttatt ctgagcctcg ccccatcggc acccgttacc tcacccgtaa tctg 2214

5 <210> 13  
<211> 737  
<212> PRT  
<213> Virus adeno-asociado

10 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (148)..(148)  
<223> /replace="Gln"

15 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (169)..(169)  
<223> /replace="Arg"

20 <220>  
<221> VARIANTE  
<222> (314)..(314)  
<223> /replace="Asn"

25 <220>  
<221> VARIANTE

<222> (466)..(466)  
<223> /replace="His"

5 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (563)..(563)  
 <223> /replace="Ser"

10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (580)..(580)  
 <223> /replace="Ile"

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (588)..(588)  
 <223> /replace="Ser"

20 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(737)  
 <223> /nota="Los restos de variante proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variante"

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile

25



ES 2 806 054 T3

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu 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 Ala  
 435 440 445

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 806 054 T3

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

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

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

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

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

Leu

5 <210> 14  
<211> 2211  
<212> ADN  
<213> Virus adeno-asociado

10 <220>  
<221> variación  
<222> (442)..(444)  
<223> /replace="cag"

15 <220>  
<221> variación  
<222> (505)..(507)  
<223> /replace="aga"

20 <220>  
<221> variación  
<222> (940)..(942)  
<223> /replace="aac"

25 <220>  
<221> variación  
<222> (1396)..(1398)  
<223> /replace="cac"

30 <220>  
<221> variación  
<222> (1687)..(1689)  
<223> /replace="agt"

35 <220>  
<221> variación  
<222> (1738)..(1740)  
<223> /replace="ata"

40 <220>  
<221> variación

<222> (1762)..(1764)  
<223> /replace="tct"

ES 2 806 054 T3

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(2211)

5 <223> /nota="Los nucleótidos de variación proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variación"

<400> 14

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc	60
gagtgggtggg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaagcaggac	120
gacggccggg gtctggtgct tcctggctac aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac	180
aagggggagc ccgtcaacgc ggcggacgca ggggccctcg agcagcaaa ggcctacgac	240
cagcagctca aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata accacgccga cgccgagttt	300
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtcattt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag	360
gccaagaagc gggttctcga acctctcggg ctggttgagg aaggcgctaa gacggctcct	420
ggaaagaaga gaccggtaga gccgtcacct cagcgttccc ccgactcctc cacgggcatc	480
ggcaagaaag gccagcagcc cgccaaaaag agactcaatt tcggtcagac tggcgactca	540
gagtcagtcc ccgaccctca acctctcgga gaacctccag cagcgcctc tgggtgtggga	600
tctggtacaa tggctgcagg cggtggcgca ccaatggcag acaataacga aggtgccgac	660
ggagtgggta atgcctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctggg cgacagagtc	720
attaccacca gcacccgaac ctggggcctg cccacctaca acaaccacct ctacaagcaa	780
atctccagtc aaagtgcagg tagtaccaac gacaacacct acttcggcta cagcaccccc	840
tgggggtatt ttgactttaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga	900
ctcatcaaca acaactgggg attccggccc aagaagctgc ggttcaagct cttcaacatc	960
caggtcaagg aggtcacgac gaatgacggc gttacgacca tcgctaataa ccttaccagc	1020
acggttcagg tattctcgga ctcgggaatac cagctgccgt acgtcctcgg ctctgcgcac	1080
cagggctgcc tgctccggt cccggcggac gtcttcatga ttctctagta cggctacctg	1140
actctcaaca atggcagtca gtctgtggga cgttcctcct tctactgcct ggagtacttc	1200
ccctctcaga tgctgagaac gggcaacaac tttgagttca gctacacctt cgaggacgtg	1260
cctttccaca gcagctacgc acacagccag agcctggacc ggctgatgaa tcccctcatc	1320
gaccagtact tgtactacct ggccagaaca cagagtacca caggaggcac agctggcaat	1380
cgggaactgc agttttacca ggccgggcct tcaactatgg ccgaacaagc caagaattgg	1440
ttacctggac cttgctaccg gcaacaaaga gtctccaaaa cgctggatca aaacaacaac	1500
agcaactttg cttggactgg tgccacccaaa tatcacctga acggcagaaa ctctgttggtt	1560

10

ES 2 806 054 T3

```

aatcccggcg tcgccatggc aactcacaag gacgacgagg accgcttttt cccatccagc      1620
ggagtcctga tttttggaaa aactggagca gctaacaaaa ctacattgga aaatgtgtta      1680
atgacaaatg aagaagaaat taaaactact aatcctgtag ccacggaaga atacggggta      1740
gtcagcagca acttacaatc ggctaatact gcaccccaga cacaaactgt caacagccag      1800
ggagccttac ctggcatggt ctggcagaac cgggacgtgt acctgcaggg tcccatctgg      1860
gccaagattc ctcacacgga tggcaacttt caccctctc ctttgatggg cggttttggga      1920
cttaaacatc cgcctcctca gatcctgatc aagaacactc ccgttcccgc taatcctccg      1980
gaggtgttta ctctgccaa gtttgcttgc ttcacacac agtacagcac cggacaagtc      2040
agcgtggaaa tcgagtggga gctgcagaag gaaaacagca agcgtggaa cccggagatt      2100
cagtacacct ccaactatga taagtcgact aatgtggact ttgccgttga cagcgagggg      2160
gtttactctg agcctcgccc tattggcact cgttacctca cccgtaatct g              2211

```

5 <210> 15  
 <211> 735  
 <212> PRT  
 <213> Virus adeno-asociado

10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (162)..(162)  
 <223> /replace="Thr"

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (168)..(168)  
 <223> /replace="Arg"

20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (224)..(224)  
 <223> /replace="Ser"

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (310)..(310)  
 <223> /replace="Lys"

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (410)..(410)  
 <223> /replace="Gln"

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (446)..(446)  
 <223> /replace="Asn"

40 <220>  
 <221> VARIANTE

<222> (461)..(461)  
 <223> /replace="Leu"

ES 2 806 054 T3

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (471)..(471)  
 <223> /replace="Ser"

5

<220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (708)..(708)  
 <223> /replace="Thr"

10

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(735)  
 <223> /nota="Los restos de variante proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variante"

15

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 806 054 T3

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

Ala Ala Pro Ser Gly Val 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 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 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 Thr Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu  
325 330 335

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

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

Val Phe Met Ile 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

ES 2 806 054 T3

Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr  
 435 440 445  
 Gln Thr Thr Ser Gly Thr Ala Gln Asn Arg Glu Leu Gln Phe Ser Gln  
 450 455 460  
 Ala Gly Pro Ser Ser Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ala Asn Asp Asn Asn  
 485 490 495  
 Asn Ser Asn Phe Ala 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 Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys  
 530 535 540  
 Gln Gly Ala Gly Ala Ser Asn Val Asp Leu Asp Asn Val Met Ile Thr  
 545 550 555 560  
 Asp Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr  
 565 570 575  
 Gly Thr Val Ala Thr Asn Leu Gln Ser Ser Asn Thr Ala Pro Ala Thr  
 580 585 590  
 Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala 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 Pro Thr Thr Phe Ser Pro 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

ES 2 806 054 T3

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

Asn Lys Ser Ala 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

5 <210> 16  
 <211> 2205  
 <212> ADN  
 <213> Virus adeno-asociado

10 <220>  
 <221> variación  
 <222> (484)..(486)  
 <223> /replace="aca"

15 <220>  
 <221> variación  
 <222> (502)..(504)  
 <223> /replace="aga"

20 <220>  
 <221> variación  
 <222> (670)..(672)  
 <223> /replace="tcc"

25 <220>  
 <221> variación  
 <222> (928)..(930)  
 <223> /replace="aaa"

30 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1228)..(1230)  
 <223> /replace="cag"

35 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1336)..(1338)  
 <223> /replace="aac"

40 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1381)..(1383)  
 <223> /replace="ctg"

45 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1411) .. (1413)  
 <223> /replace="tct"

50 <220>  
 <221> variación

<222> (2122) .. (2124)  
 <223> /replace="acc"

55 <220>

ES 2 806 054 T3

<221> misc\_feature

<222> (1)..(2205)

<223> /nota="Los nucleótidos de variación proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variación"

5

<400> 16

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc	60
gagtgggtggg acttgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaagcaggac	120
gacggccggg gtctgggtgct tcctggctac aagtacctcg gacccttcaa cggactcgac	180
aagggggagc ccgtcaacgc ggcggatgca gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac	240
cagcagctca aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata accacgccga cgccgagttt	300
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag	360
gccaagaaga gggttctcga acctcttggc ctggttgagg aaggtgctaa gacggctcct	420
ggaaagaaac gtccggtaga gcagtcgcca caagagccag actcctcctc gggcattggc	480
aagtcaggcc agcagcccgc taaaaagaga ctcaattttg gtcagactgg cgactcagag	540
tcagtccccg acccacaacc tctcggagaa cctccagcag cccctctgg tgtgggatct	600
aatacaatgg cttcaggcgg tggcgcacca atggcagaca ataacgaagg cgccgacgga	660
gtgggtaatg cctcaggaaa ttggcattgc gattccacat ggctgggcga cagagtcac	720
accaccagca cccgaacatg ggccttgccc acctataaca accacctcta caagcaaadc	780
tccagtcaat cagggggccag caacgacaac cactacttcg gctacagcac cccctggggg	840
tatthtgatt tcaacagatt cactgccat ttctcaccac gtgactggca gcgactcac	900
aacaacaatt ggggattccg gcccaagaga ctcaacttca agctcttcaa catccaagtc	960
aaggagggtca cgacgaatga tggcaccagc accatcgcta ataaccttac cagcagcgtt	1020
caagtcttca cggactcgga gtaccagttg ccgtacgtcc tcggctctgc gcaccagggc	1080
tgctccctc cgttcccggc ggacgtgttc atgattccgc agtacggcta cctaacgctc	1140
aacaatggca gccaggcagt gggacggtca tccttttact gcctggaata tttcccatcg	1200
cagatgctga gaacgggcaa taactttacc ttcagctaca ccttcgagga cgtgcctttc	1260
cacagcagct acgcgcacag ccagagcctg gaccggctga tgaatcctct catcgaccag	1320
tacctgtatt acctgagcag aactcagact acgtccggaa ctgcccaaaa cagggagttg	1380
cagtttagcc agggcgggtcc atctagcatg gctaatacagg ccaaaaactg gctacctgga	1440
ccctgttacc ggcagcagcg cgtttctaaa acagcaaatg acaacaacaa cagcaacttt	1500
gcctggactg gtgctacaaa atatcacctt aatgggcgtg attctttagt caaccctggc	1560
cctgctatgg cctcacacaa agacgacgaa gacaagttct ttcccatgag cgggtgtctg	1620

ES 2 806 054 T3

atttttggaa agcagggcgc cggagcttca aacgttgatt tggacaatgt catgatcaca 1680  
 gacgaagagg aatcaaaac cactaaccctc gtggccaccg aacaatatgg gactgtggca 1740  
 accaatctcc agagcagcaa cacagcccct gcgaccggaa ctgtgaattc tcagggagcc 1800  
 ttacctgaa tgggtgtggca agacagagac gtatacctgc agggtcctat ttgggcaaaa 1860  
 attcctcaca cggatggaca ctttcaccctg tctcctctca tgggaggctt tggacttaag 1920  
 caccgcctc ctcagatcct catcaaaaac acgcctgttc ctgcgaatcc tccgacaacg 1980  
 ttttcgcctg caaagtttgc ttcattcatc acccagtatt ccacaggaca agtgagcgtg 2040  
 gagattgaat gggagctgca gaaagaaaac agcaaacgct ggaatcccga aatacagtat 2100  
 acatctaact ataataaatc tgccaacgct gatttcactg tggacaccaa tggagtttat 2160  
 agtgagcctc gcccattgg cacccttac ctcaccctga aactg 2205

5 <210> 17  
 <211> 735  
 <212> PRT  
 <213> Virus adeno-asociado

10 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (42)..(42)  
 <223> /replace="Ser"

15 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (168)..(168)  
 <223> /replace="Lys"

20 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (310)..(310)  
 <223> /replace="Arg"

25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (410)..(410)  
 <223> /replace="Gln"

30 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (446)..(446)  
 <223> /replace="Arg"

35 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (461)..(461)  
 <223> /replace="Leu"

40 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (471)..(471)  
 <223> /replace="Ser"

45 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (475)..(475)

ES 2 806 054 T3

<223> /replace="Arg"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 5 <222> (504)..(504)  
 <223> /replace="Ala"

<220>  
 <221> VARIANTE  
 10 <222> (539)..(539)  
 <223> /replace="Asn"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 15 <222> (1)..(735)  
 <223> /nota="Los restos de variante proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variante"

<400> 17

20

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	Gln	Pro
			20					25					30		
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	His	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	Glu	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp
65					70					75					80
Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Lys	Tyr	Asn	His	Ala
				85					90					95	
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly
			100					105					110		
Asn	Leu	Gly	Arg	Ala	Val	Phe	Gln	Ala	Lys	Lys	Arg	Val	Leu	Glu	Pro
		115					120					125			
Leu	Gly	Leu	Val	Glu	Glu	Ala	Ala	Lys	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Arg
	130					135					140				
Pro	Val	Glu	Gln	Ser	Pro	Gln	Glu	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Gly	Ile	Gly
145					150					155					160

ES 2 806 054 T3

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

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

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

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

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

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

Val Phe Met Ile 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

ES 2 806 054 T3

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

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

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

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

Asn Ser Asn Phe Ala 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 Met His Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys  
 530 535 540

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

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

ES 2 806 054 T3

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

5 <210> 18  
 <211> 2205  
 <212> ADN  
 <213> Virus adeno-asociado

10 <220>  
 <221> variación  
 <222> (124)..(126)  
 <223> /replace="agt"

15 <220>  
 <221> variación  
 <222> (502)..(504)  
 <223> /replace="aaa"

20 <220>  
 <221> variación  
 <222> (928)..(930)  
 <223> /replace="aga"

25 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1228) .. (1230)  
 <223> /replace="cag"

30 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1336) .. (1338)  
 <223> /replace="aga"

35 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1381)..(1383)  
 <223> /replace="ctc"

40 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1411) .. (1413)  
 <223> /replace="tct"

45 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1423)..(1425)

<223> /replace="aga"

ES 2 806 054 T3

5 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1510)..(1512)  
 <223> /replace="gcg"

10 <220>  
 <221> variación  
 <222> (1615)..(1617)  
 <223> /replace="gac"

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2205)  
 <223> /nota="Los nucleótidos de variación proporcionados en la secuencia no tienen preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para las posiciones de variación"

<400> 18

```

atggctgctg acggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctttctga aggcattcgt      60
gagtgggtggg atctgaaacc tggagcccct caacccaaag cgaaccaaca acaccaggac      120
gacggtcggg gtcttgtgct tccgggttac aaatacctcg gaccctttaa cggactcgac      180
aaaggagagc cgggtcaacga ggcggacgcg gcagccctcg aacacgacaa agcttacgac      240
cagcagctca aggccggtga caaccctgac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttt      300
caggagcgtc ttcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc ttggcagagc agtcttccag      360
gccaaaaga gggctccttga gcctcttggg ctgggtgagg aagcagctaa aacggctcct      420
ggaaagaaga ggcctgtaga acagtctcct caggaaccgg actcatcatc tggatttggc      480
aaatcgggcc aacagcctgc cagaaaaaga ctaaatttcg gtcagactgg agactcagag      540
tcagtcccag accctcaacc tctcggagaa ccaccagcag cccctcagg tgtgggatct      600
aatacaatgg cttcaggcgg tggcgcacca atggcagaca ataacgaggg tgccgatgga      660
gtgggtaatt cctcaggaaa ttggcattgc gattccacat ggctgggcga cagagtcac      720
accaccagca ccagaacctg ggccctgccc acttacaaca accatctcta caagcaaata      780
tccagccaat caggagcttc aaacgacaac cactactttg gctacagcac cccttggggg      840
tattttgact ttaacagatt ccaactgccac ttctcaccac gtgactggca gcgactcatt      900
aacaacaact ggggattccg gcccaagaaa ctcaacttca agctcttcaa catccaagtt      960
aaagaggtca cgcagaacga tggcacgacg actattgcc aataaccttac cagcacgggt      1020
caagtgttta cggactcggg gtatcagctc ccgtacgtgc tcgggtcggc gcaccaaggc      1080
tgtctcccgc cgtttccagc ggacgtcttc atgatccctc agtatggata cctcaccctg      1140
aacaacggaa gtcaagcggg gggacgctca tccttttact gcctggagta cttcccttcg      1200
cagatgctaa ggactggaaa taacttcaca ttcagctata ccttogagga tgtacctttt      1260
cacagcagct acgctcacag ccagagtttg gatcgcttga tgaatcctct tattgatcag      1320

```

20

ES 2 806 054 T3

tatctgtact acctgagcag aacgcaaaca acctctggaa caaccaaca atcacggctg	1380
caatttagcc aggctgggcc ttcgtctatg gctcagcagg ccaaaaattg gctacctggg	1440
ccctgctacc ggcaacagag agtttcaaag actgctaacg acaacaacaa cagtaacttt	1500
gcttgacag gggccaccaa atatcatctc aatggccgcg actcgctggg gaatccagga	1560
ccagctatgg ccagtcacaa ggacgatgaa gaaaaatfff tccctatgca cggcgttcta	1620
atatttgga aacaaggac aggggcaagt aacgtagatt tagataatgt aatgattacg	1680
gatgaagaag agattcgtac caccaatcct gtggcaacag agcagtatgg aactgtggca	1740
actaacttgc agagctcaaa tacagctccc gcgactggaa ctgtcaatag tcagggggcc	1800
ttacctggca tgggtggca agatcgtgac gtgtacctc aaggacctat ctgggcaaag	1860
attcctcaca cggatggaca ctttcactct tctcctctga tgggaggctt tggactgaaa	1920
catccgcctc ctcaaactct gatcaaaaat actccggtac cggcaaactc tccgacgact	1980
ttcagcccgg ccaagtttgc ttcatttatc actcagtact ccaactggaca ggtcagcgtg	2040
gaaattgagt gggagctaca gaaagaaaac agcaaactgt ggaatccaga gattcagtac	2100
acttccaact acaacaagtc tgттаatgtg gactttactg tagacactaa tgggtgtttat	2160
agtgaacctc gccctattgg aaccgggtat ctcacacgaa acttg	2205

<210> 19  
 <211> 736  
 <212> PRT  
 <213> Virus adeno-asociado

5

<400> 19

ES 2 806 054 T3

Met	Ala	Ala	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Trp	Leu	Glu	Asp	Asn	Leu	Ser
1				5					10					15	
Glu	Gly	Ile	Arg	Glu	Trp	Trp	Asp	Leu	Lys	Pro	Gly	Ala	Pro	Lys	Pro
			20					25					30		
Lys	Ala	Asn	Gln	Gln	Lys	Gln	Asp	Asp	Gly	Arg	Gly	Leu	Val	Leu	Pro
		35					40					45			
Gly	Tyr	Lys	Tyr	Leu	Gly	Pro	Phe	Asn	Gly	Leu	Asp	Lys	Gly	Glu	Pro
	50					55					60				
Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	Asp	Lys	Ala	Tyr	Asp
65					70					75					80
Gln	Gln	Leu	Lys	Ala	Gly	Asp	Asn	Pro	Tyr	Leu	Arg	Tyr	Asn	His	Ala
				85					90					95	
Asp	Ala	Glu	Phe	Gln	Glu	Arg	Leu	Gln	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Gly	Gly
			100					105					110		

ES 2 806 054 T3

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro  
 115 120 125  
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro 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 Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Asn Thr Met Ala Ala 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 Gln Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp Asn Thr  
 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 Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn  
 325 330 335  
 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr 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

ES 2 806 054 T3

	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	Glu	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	Ser	Arg				
		435					440					445							
Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Gln	Phe	Ser				
	450					455					460								
Gln	Ala	Gly	Pro	Ser	Ser	Met	Ala	Asn	Gln	Ala	Lys	Asn	Trp	Leu	Pro				
465					470					475					480				
Gly	Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Lys	Thr	Ala	Asn	Gln	Asn				
				485					490					495					
Asn	Asn	Ser	Asn	Phe	Ala	Trp	Thr	Gly	Ala	Thr	Lys	Tyr	His	Leu	Asn				
			500					505					510						
Gly	Arg	Asp	Ser	Leu	Val	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Thr	His	Lys				
		515					520					525							
Asp	Asp	Glu	Asp	Lys	Phe	Phe	Pro	Met	Ser	Gly	Val	Leu	Ile	Phe	Gly				
	530					535					540								
Lys	Gln	Gly	Ala	Gly	Asn	Ser	Asn	Val	Asp	Leu	Asp	Asn	Val	Met	Ile				
545					550					555					560				
Thr	Asn	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Gln				
				565					570					575					
Tyr	Gly	Thr	Val	Ala	Thr	Asn	Leu	Gln	Ser	Ala	Asn	Thr	Ala	Pro	Ala				
			580					585					590						
Thr	Gly	Thr	Val	Asn	Ser	Gln	Gly	Ala	Leu	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln				
		595					600					605							

ES 2 806 054 T3

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 Leu 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 Thr Asn Val Asp Phe Ala 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

5

<210> 20  
 <211> 736  
 <212> PRT  
 <213> Virus adeno-asociado  
 <400> 20

ES 2 806 054 T3

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

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

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

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

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

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

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

ES 2 806 054 T3

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	Lys	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	Val	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	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	Gln	Ser	Gly	Ala	Ser	Thr	Asn	Asp	Asn	Thr
			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	Thr	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn	Asn
				325					330					335	
Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln	Leu	Pro
			340					345					350		

ES 2 806 054 T3

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 Gln 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 Ser Arg  
 435 440 445

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 806 054 T3

Asn 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 Leu 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 Thr Asn Val Asp Phe Ala 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> 21  
 <211> 736  
 <212> PRT  
 <213> Virus adeno-asociado  
 <400> 21

5

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 806 054 T3

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 Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Asn Thr Met Ala Ala 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 Gln Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp Asn Thr  
 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 Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn  
 325 330 335  
 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro  
 340 345 350

ES 2 806 054 T3

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 Glu 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 Ser Arg  
 435 440 445  
 Thr Gln Thr Thr Ser Gly Thr Ala Gly Asn Arg Glu Leu Gln Phe Ser  
 450 455 460  
 Gln Ala Gly Pro Ser Ser Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Thr Asn Gln Asn  
 485 490 495  
 Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn  
 500 505 510  
 Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Thr His Lys  
 515 520 525  
 Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly  
 530 535 540  
 Lys Gln Gly Ala Gly Asn Ser Asn Val Asp Leu Asp Asn Val Met Ile  
 545 550 555 560  
 Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu  
 565 570 575  
 Tyr Gly Thr Val Ala Thr Asn Leu Gln Ser Ser Asn Thr Ala Pro Ala  
 580 585 590  
 Thr Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln  
 595 600 605

ES 2 806 054 T3

Glu 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 Leu 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 Thr Asn Val Asp Phe Ala 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> 22  
 <211> 736  
 <212> PRT  
 <213> Virus adeno-asociado

5

<400> 22

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 806 054 T3

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 Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Pro Ser Gly Val 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 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 Gln Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp Asn Thr  
 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 Lys Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln  
 305 310 315 320  
 Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn  
 325 330 335  
 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro  
 340 345 350

ES 2 806 054 T3

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 Glu 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 Ser Arg  
 435 440 445

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln

ES 2 806 054 T3

		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	Leu	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	Thr	Asn	Val	Asp	Phe	Ala	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> 23  
 <211> 736  
 <212> PRT  
 <213> Virus adeno-asociado

5

<400> 23

ES 2 806 054 T3

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

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

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

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

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

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

ES 2 806 054 T3

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 Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Asn Thr Met Ala Ala 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 Gln Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp Asn Thr  
 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 Lys Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln  
 305 310 315 320  
 Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn  
 325 330 335  
 Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro

ES 2 806 054 T3

			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	Gln	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	Ser	Arg		
		435					440					445					
Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Asn	Arg	Thr	Leu	Gln	Phe	Ser		
	450					455					460						
Gln	Ala	Gly	Pro	Ser	Ser	Met	Ala	Asn	Gln	Ala	Lys	Asn	Trp	Leu	Pro		
465					470					475					480		
Gly	Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Lys	Thr	Thr	Asn	Gln	Asn		
				485					490					495			
Asn	Asn	Ser	Asn	Phe	Ala	Trp	Thr	Gly	Ala	Thr	Lys	Tyr	His	Leu	Asn		
			500					505					510				
Gly	Arg	Asp	Ser	Leu	Val	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Thr	His	Lys		
		515					520					525					
Asp	Asp	Glu	Asp	Lys	Phe	Phe	Pro	Met	Ser	Gly	Val	Leu	Ile	Phe	Gly		
	530					535					540						
Lys	Gln	Gly	Ala	Gly	Asn	Ser	Asn	Val	Asp	Leu	Asp	Asn	Val	Met	Ile		
545					550					555					560		
Thr	Asn	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Glu		
				565					570					575			
Tyr	Gly	Thr	Val	Ala	Thr	Asn	Leu	Gln	Ser	Ala	Asn	Thr	Ala	Pro	Ala		
			580					585					590				

ES 2 806 054 T3

Thr Gly Thr Val Asn Ser 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 Leu 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 Thr Asn Val Asp Phe Ala 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

5

- <210> 24
- <211> 736
- <212> PRT
- <213> Virus adeno-asociado
- <400> 24

ES 2 806 054 T3

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

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

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

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

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

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala



ES 2 806 054 T3

Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr 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 Glu 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 Ser Arg  
 435 440 445

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 806 054 T3

Thr Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu 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 His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu  
625 630 635 640

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

Asn Pro Pro 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 Thr Asn Val Asp Phe Ala 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> 25  
<211> 736  
<212> PRT  
<213> Virus adeno-asociado

5

<400> 25

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

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

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

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

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

10

ES 2 806 054 T3

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

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

ES 2 806 054 T3

Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr 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 Glu 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 Ser Arg  
435 440 445

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 806 054 T3

Thr Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu 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 His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu  
 625 630 635 640

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

Asn Pro Pro 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 Thr Asn Val Asp Phe Ala 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> 26  
 <211> 736  
 <212> PRT  
 <213> Virus adeno-asociado

5

<400> 26

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

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

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

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

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

10

ES 2 806 054 T3

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

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

ES 2 806 054 T3

Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr 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 Gln 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 Ser Arg  
 435 440 445

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Gly Thr Val Ala Thr Asn Leu Gln Ser Ala Asn Thr Ala Pro Ala



ES 2 806 054 T3

tgctgttgac agtgagcgaa cccaacctgt ccatcattat tagtgaagcc acagatgtaa 60  
 taatgatgga caggttgggt gtgcctactg cctcgga 97

<210> 29  
 <211> 97  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia que codifica ARNsh

<400> 29

tgctgttgac agtgagcgag ctgagttcct caaggtcaag tagtgaagcc acagatgtac 60  
 ttgacctga ggaactcagc ctgcctactg cctcgga 97

<210> 30  
 <211> 97  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia que codifica ARNsh

<400> 30

tgctgttgac agtgagcgct cagtcaagag cattgccaaag tagtgaagcc acagatgtac 60  
 ttggcaatgc tcttgactga atgcctactg cctcgga 97

<210> 31  
 <211> 97  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia que codifica ARNsh

<400> 31

tgctgttgac agtgagcgac ctgtctggct tctcttctac tagtgaagcc acagatgtag 60  
 tagaagagaa gccagacagg gtgcctactg cctcgga 97

<210> 32  
 <211> 97  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> secuencia que codifica ARNsh

<400> 32

tgctgttgac agtgagcgag ctgagttcct caaggtcaag tagtgaagcc acagatgtac 60  
 ttgacctga ggaactcagc ctgcctactg cctcgga 97

<210> 33  
 <211> 97  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> ARNsh en proteína fluorescente verde

<400> 33

ES 2 806 054 T3

tgctgttgac agtgagcgct ctccgaacgt gtatcacggt tagtgaagcc acagatgtaa 60  
acgtgataca cgttcggaga ttgcctactg cctcggga 97

5 <210> 34  
<211> 6231  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> vector pZac2.1-CASI.PRPR31

<400> 34

ES 2 806 054 T3

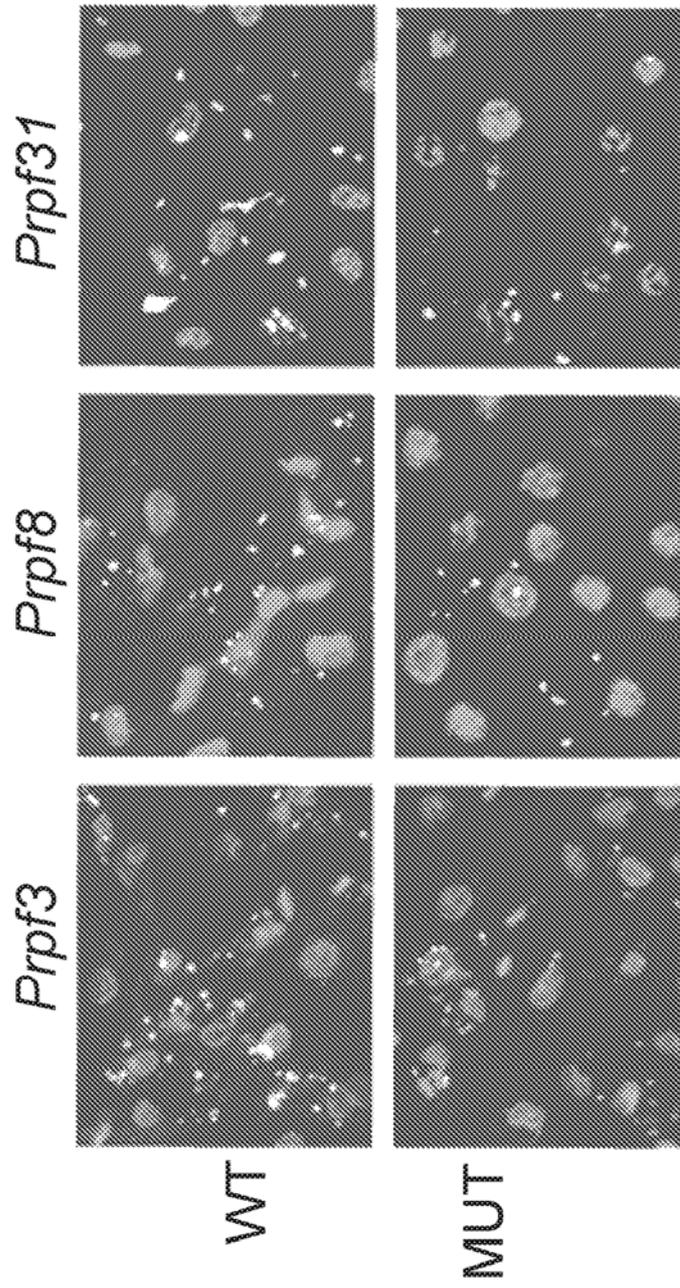
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgctcg ggcgacctt 60  
 ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120  
 aggggttccct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180  
 aggaagatcg gaattcggag ttccgcgta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct 240  
 gaccgccc aa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc 300  
 caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaaact gccacttgg 360  
 cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat 420  
 ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttctact tggcagtaca 480  
 tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tccgaggtgag ccccacgttc tgcttctact 540  
 tccccatctc cccccctcc ccacccccaa ttttgtattt atttattttt taattatttt 600  
 gtgcagcgat gggggcgggg gggggggggg ggcgcgcgcc agggcggggcg gggcggggcg 660  
 aggggcgggg cggggcgagg cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc 720  
 gaaagtttcc ttttatggcg aggcggcggc ggcgggcgcc ctataaaaag cgaagcgcg 780  
 ggcgggcggg agtgcgtgcg cgctgccttc gccccgtgcc ccgctccgcc gccgcctcgc 840  
 gccgcccgcc ccggctctga ctgaccgcgt tactaaaaca ggtaagtccg gcctccgcgc 900  
 cgggttttgg cgcctcccgc gggcgcccc ctctcacgg cgagcgctgc cacgtcagac 960  
 gaagggcgca cggagcgtcc tgatccttcc gcccggacgc tcaggacagc ggcccgcgtc 1020  
 tcataagact gggccttaga accccagtat cagcagaagg acattttagg acgggacttg 1080  
 ggtgactcta gggcactggt tttctttcca gagagcggaa caggcgagga aaagtagtcc 1140  
 cttctcggcg attctcggga gggatctccg tggggcgggtg aacgccgatg atgcctctac 1200  
 taaccatggt catgttttct ttttttttct acaggtcctg ggtgacgaac aggctagcgc 1260  
 caccatgggt aagcctatcc ctaaccctct cctcggctctc gattctacgg ccgccacat 1320  
 gtctctggca gatgagctct tagctgatct cgaagaggca gcagaagagg aggaaggagg 1380  
 aagctatggg gaggaagaag aggagccagc gatcgaggat gtgcaggagg agacacagct 1440  
 ggatctttcc ggggattcag tcaagaccat cgccaagcta tgggatagta agatgtttgc 1500  
 tgagattatg atgaagattg aggagtatat cagcaagcaa gccaaagctt cagaagtgat 1560  
 gggaccagtg gaggccgcgc ctgaataccg taagttcctg gatgccaaca acctgacctg 1620  
 ggagatcgaa aacgagctga acatcatcca taagttcctc cgggataagt actcaaagag 1680  
 attccctgaa ctggagctct tggccccaa tgcactggat tacatccgca cggcgaagga 1740  
 gctgggcaac agcctggaca agtgcaagaa caatgagaac ctgcagcaga tcctcacaa 1800  
 tgccaccatc atggtcgtca gcgtcaccgc ctccaccacc caggggcagc agctgtcgg 1860  
 ggaggagctg gagcggctgg aggaggcctg cgacatggcg ctggagctga acgcctcaa 1920  
 gcaccgcatc tacgagtatg tggagtcccg gatgtccttc atcgcacca acctgtccat 1980  
 cattatcggg gcatccacgg ccgccaagat catgggtgtg gccggcggcc tgaccaacct 2040  
 ctccaagatg cccgcctgca acatcatgct gctcggggcc cagcgcaaga cgctgtcggg 2100  
 cttctcgtct acctcagtcg tgcccccacac cggctacatc taccacagtg acatcgtgca 2160  
 gtccctgcca ccgatctgc ggcggaagc ggcccggctg gtggccgcca agtgcacact 2220  
 ggcagcccgt gtggacagtt tccacgagag cacagaaggg aaggtgggtg acgaagtga 2280  
 ggatgagatc gagcgcaaat tcgacaagtg gcagagccg ccgctgtga agcaggtgaa 2340  
 gccgctgcct gcgcccctgg atggacagcg gaagaagcga ggcgccgca ggtaccgcaa 2400  
 gatgaaggag cggctggggc tgacggagat ccggaagcag gccaacgta tgagcttcgg 2460  
 agagatcgag gaggacgcct accaggagga cctgggattc agcctgggcc acctgggcaa 2520  
 gtcgggcagt gggcgtgtgc ggcagacaca ggtaaacgag gccaccaagg ccaggatctc 2580  
 caagacgctg cagcggaccc tgcagaagca gagcgtcgtat atggcggga agtccacat 2640  
 ccgcgaccgc tcctcgggca cggcctccag cgtggccttc acccactcc agggcctgga 2700  
 gattgtgaac ccacagggcg cagagaagaa ggtggctgag gccaacgaga agtatttctc 2760  
 cagcatggct gagttcctca aggtcaaggg cgagaagagt ggccttatgt ccacctgaac 2820  
 cggttggcta ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt gtgttggaa tttttgtgtc 2880  
 tctcactcgg aaggacatat gggagggcaa atcatttaaa acatcagaat gagtatttgg 2940  
 tttagagttt ggcaacatat gcccatatgc tggctgccat gaacaaaggt tggctataaa 3000  
 gaggctcatca gtatatgaaa cagccccctg ctgtccattc cttattccat agaaaagcct 3060  
 tgacttgagg ttagattttt tttatatttt gttttgtgtt attttttct ttaacatccc 3120  
 taaaattttc cttacatggt ttactagcca gatttttct cctctcctga ctactcccag 3180  
 tcatagctgt ccctcttctc ttatggagat cggatccgaa ttcccgataa ggatcttctc 3240  
 agagcatggc tacgtagata agtagcatgg cgggttaatc attaactaca aggaaccctc 3300  
 agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgtcgc ctactgagg ccgggcgacc 3360  
 aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag 3420  
 ccttaattaa cctaattcac tggccgtcgt tttacaacgt cgtgactggg aaaaccctgg 3480

ES 2 806 054 T3

cgttacccea cttaatcgcc ttgcagcaca tccccctttc gccagctggc gtaatagcga 3540  
 agaggcccgc accgatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg aatgggacgc 3600  
 gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac 3660  
 acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc tcgccacggt 3720  
 cgcgggcttt ccccgtaag ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc 3780  
 tttacggcac ctgcaccca aaaaacttga ttagggatgat gggtcacgta gtgggccatc 3840  
 gccctgatag acgggtttttc gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact 3900  
 cttggtccaa actggaacaa cactcaacc tatctcggtc tattcctttg atttataagg 3960  
 gattttgccc atttcggcct attgggttaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc 4020  
 gaattttaac aaaatattaa cgtttataat ttcagggtggc atctttcggg gaaatgtgcg 4080  
 cggaaacctt atttgtttat ttttctaaat acattcaa atgtatccgc tcatgagaca 4140  
 ataacctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt 4200  
 ccgtgtcgcc cttattccct tttttgcggc attttgctt cctgtttttg ctaccacaga 4260  
 aacgttggtg aaagtaaaag atgctgaaga tcagtgggtt gcacgagtgg gttacatcga 4320  
 actggatctc aatagtggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat 4380  
 gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg acgccgggca 4440  
 agagcaactc ggtgcgcgca tacactattc tcagaatgac ttgggtttagt actcaccagt 4500  
 cacagaaaag catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac 4560  
 catgagtgat aacactgagg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct 4620  
 aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt ggaaccgga 4680  
 gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg tgaccaccag atgcctgtag taatggtaac 4740  
 aacgttgccg aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat 4800  
 agactggatg gaggcgggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg 4860  
 ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc 4920  
 agggggcca gatggaagc cctcccgtat cgtagtatc tacacgacgg gtagcaggc 4980  
 aactatggat gaacgaaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg 5040  
 gtaactgtca gaccaagttt actcatatat actttagatt gatttaaaac ttcattttta 5100  
 atttaaaagg atctaggtga agatcctttt tgataatctc atgaccaaaa tcccttaacg 5160  
 tgagttttcg tccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga 5220  
 tccctttttt ctgocgta tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg 5280  
 ggtttgtttg ccgatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag 5340  
 agcgcagata ccaaatactg tcttctagt gtaccctag ttaggccacc acttcaagaa 5400  
 ctctgtagca ccgcctacat acctcgtctt gctaactcctg ttaccagtgg ctgctgccag 5460  
 tggcgataag tegtgtctta ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca 5520  
 gcggctgggg tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac 5580  
 cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg agaaagcgc acgcttcccg aaggagaaa 5640  
 ggcggacagg tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc 5700  
 agggggaac gcctggatc tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg 5760  
 tcgatttttg tgatgctcgt cagggggggc gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc 5820  
 ctttttacgg ttccctggcct tttgctgcgg ttttgctcac atgttctttc ctgcgttatc 5880  
 ccctgattct gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgccgag 5940  
 ccgaacgacc gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgc caatacga 6000  
 accgcctctc cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccga 6060  
 ctggaaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc 6120  
 ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca 6180  
 atttcacaca ggaaacagct atgaccatga ttacgccaga ttaattaag g 6231

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un vector de virus adeno-asociado de tipo 2 (AAV2) que comprende una secuencia que codifica PRPF31 humano, operativamente enlazado a un promotor que dirige la expresión en células de epitelio pigmentario retiniano (RPE), donde la secuencia de PRPF31 es o comprende, o codifica la misma proteína que nts 1319-2818 de SEQ ID NO:34.
2. El vector de la reivindicación 1, donde el promotor es un promotor de CAG, CASI, RPE65 o VMD2.
- 10 3. El vector de la reivindicación 1, donde la secuencia de PRPF31 está optimizada por codones.
4. El vector de cualquiera una de las reivindicaciones anteriores que comprende, adicionalmente, un polipéptido de cápside de AAV que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26.
- 15 5. Una composición farmacéutica que comprende el vector de cualquiera una de las reivindicaciones 1-4, formulada para su administración mediante inyección subretinal.
6. Una composición farmacéutica que consiste esencialmente en un sistema de suministro genético que comprende el vector de cualquiera una de las reivindicaciones 1 a 4 en un diluyente.
- 20 7. Una composición farmacéutica que consiste esencialmente en un sistema de suministro genético que comprende el vector de cualquiera una de las reivindicaciones 1 a 4 integrado en una matriz de liberación lenta.
- 25 8. La composición farmacéutica de cualquiera una de las reivindicaciones 6 y 7, en donde el sistema de suministro genético comprende adicionalmente virus asistentes, proteínas y/o lípidos.
9. La composición farmacéutica comprende una o más células recombinantes que comprenden el vector de las reivindicaciones de cualquiera una de las reivindicaciones 1 a 4.
- 30 10. El vector de las reivindicaciones 1-4, para el uso en el tratamiento de la retinitis pigmentosa provocada por mutaciones en el PRPF31 en el ojo de un sujeto humano.
11. El vector de las reivindicaciones 1-4, para el uso en el aumento de la expresión de PRPF31 en el ojo de un sujeto humano.
- 35 12. La composición farmacéutica de cualquiera una de las reivindicaciones 5 a 9, para el uso en el tratamiento de retinitis pigmentosa provocada por mutaciones en el PRPF31 en el ojo de un sujeto humano.
- 40 13. La composición farmacéutica de cualquiera una de las reivindicaciones 5 a 9, para el uso en el aumento de la expresión de PRPF31 en el ojo de un sujeto humano.



**FIG. 1A**

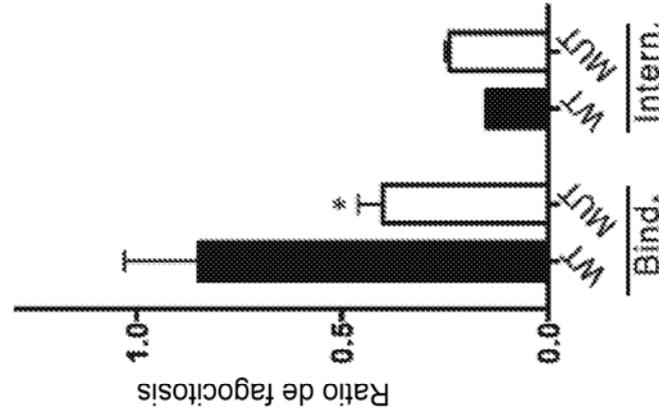


FIG. 1C

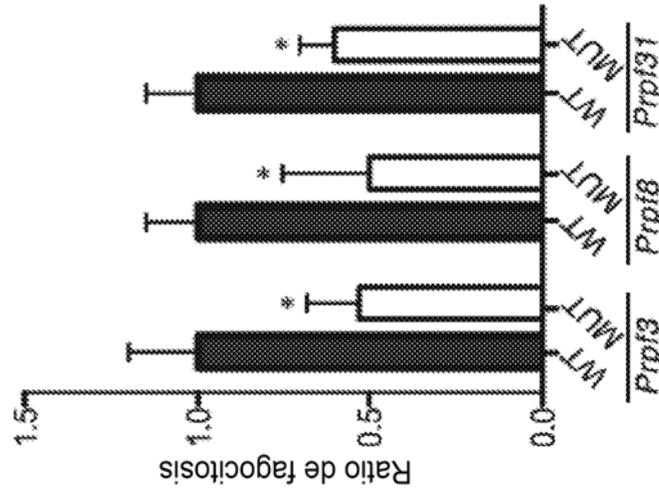


FIG. 1B

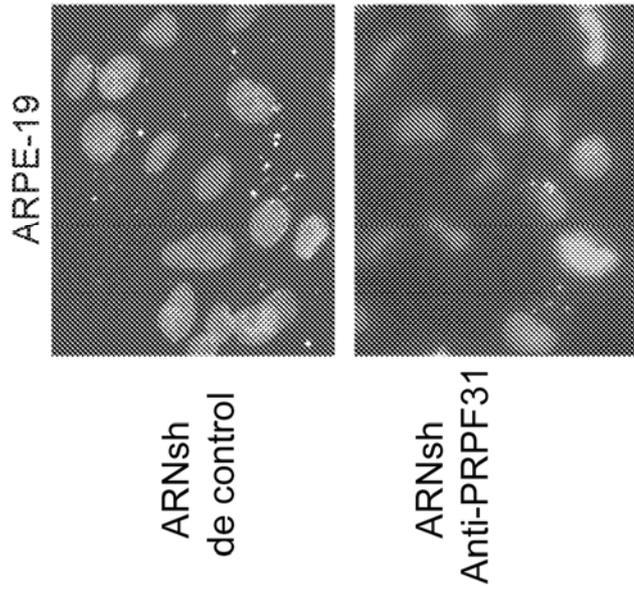


FIG. 1D

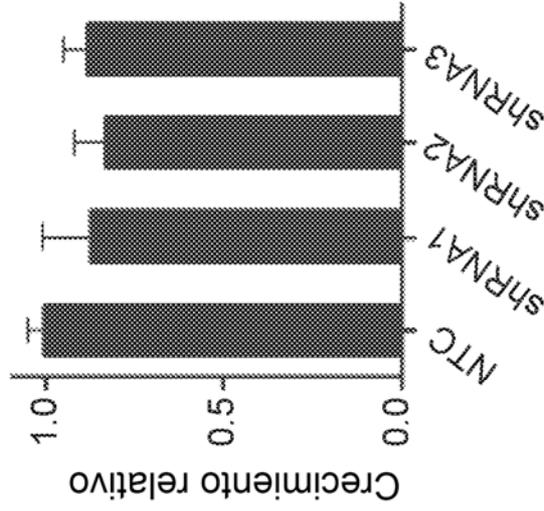


FIG. 1E

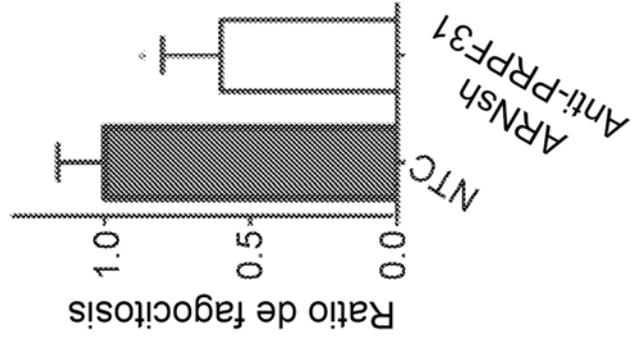
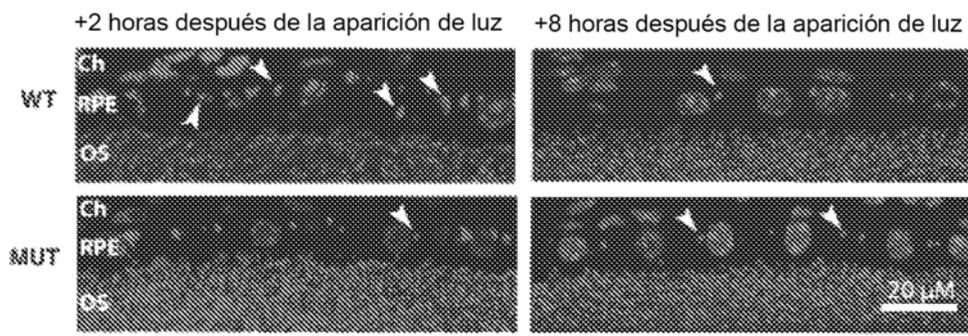
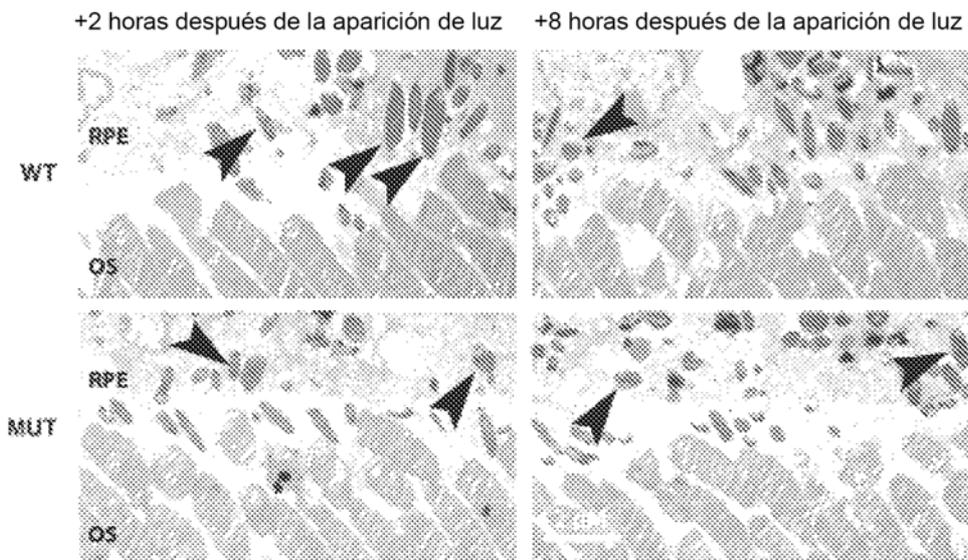


FIG. 1F



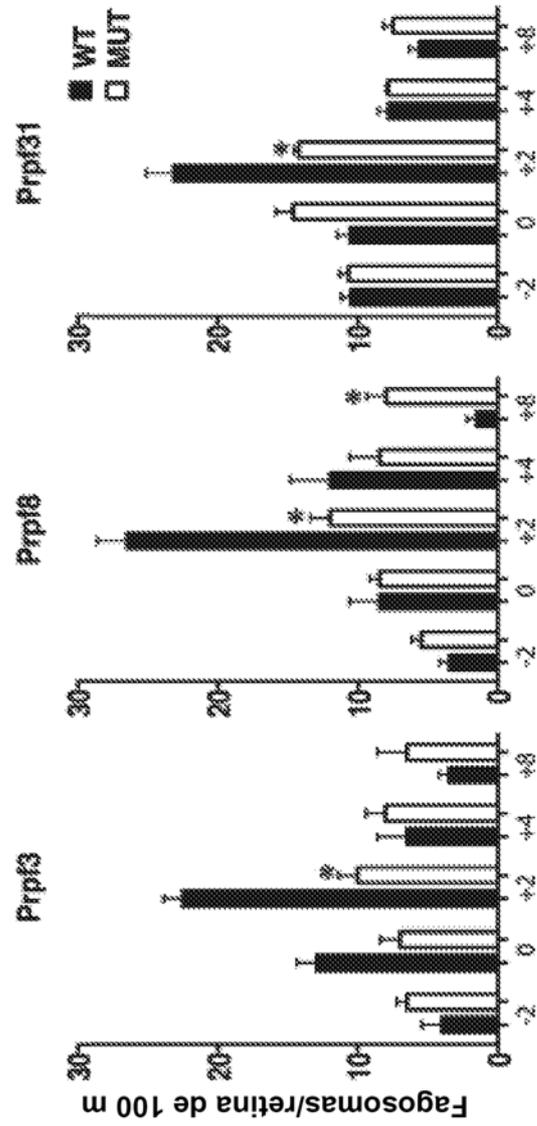
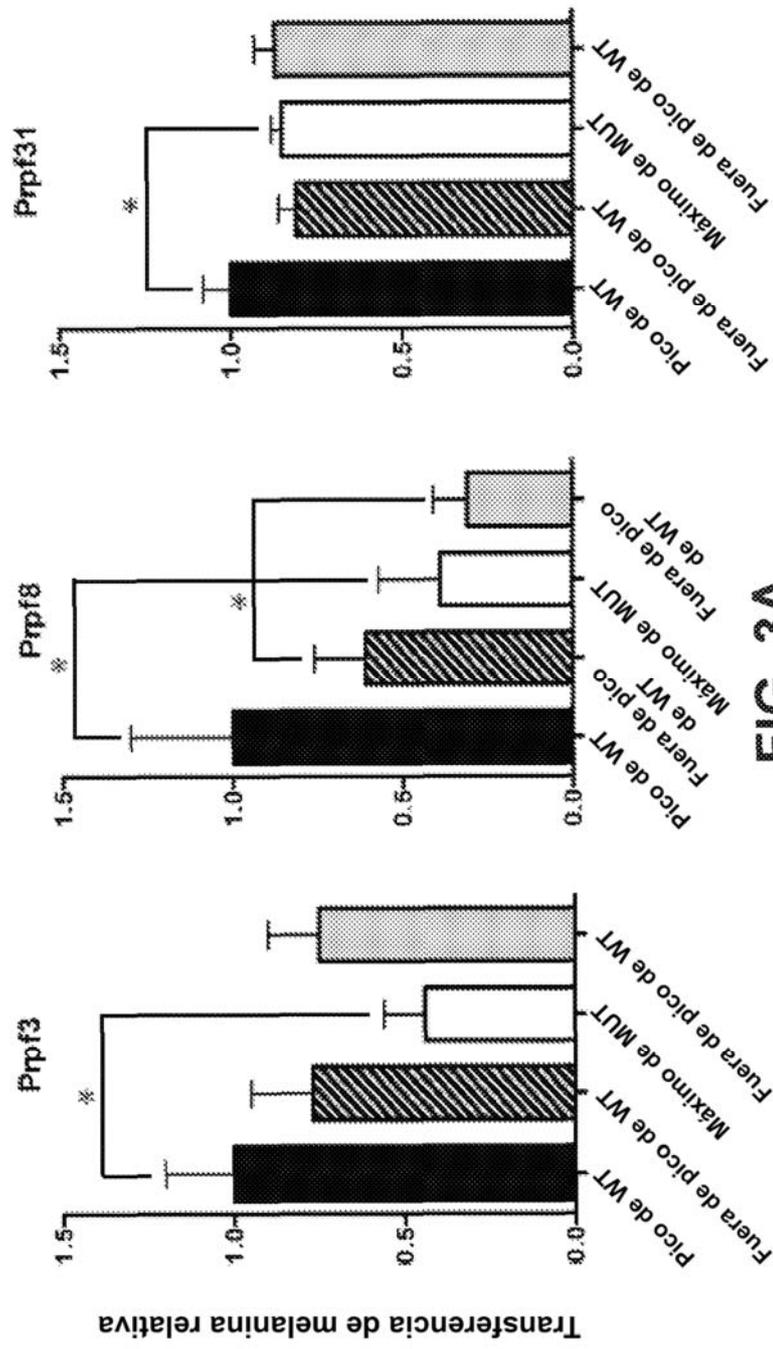


FIG. 2C



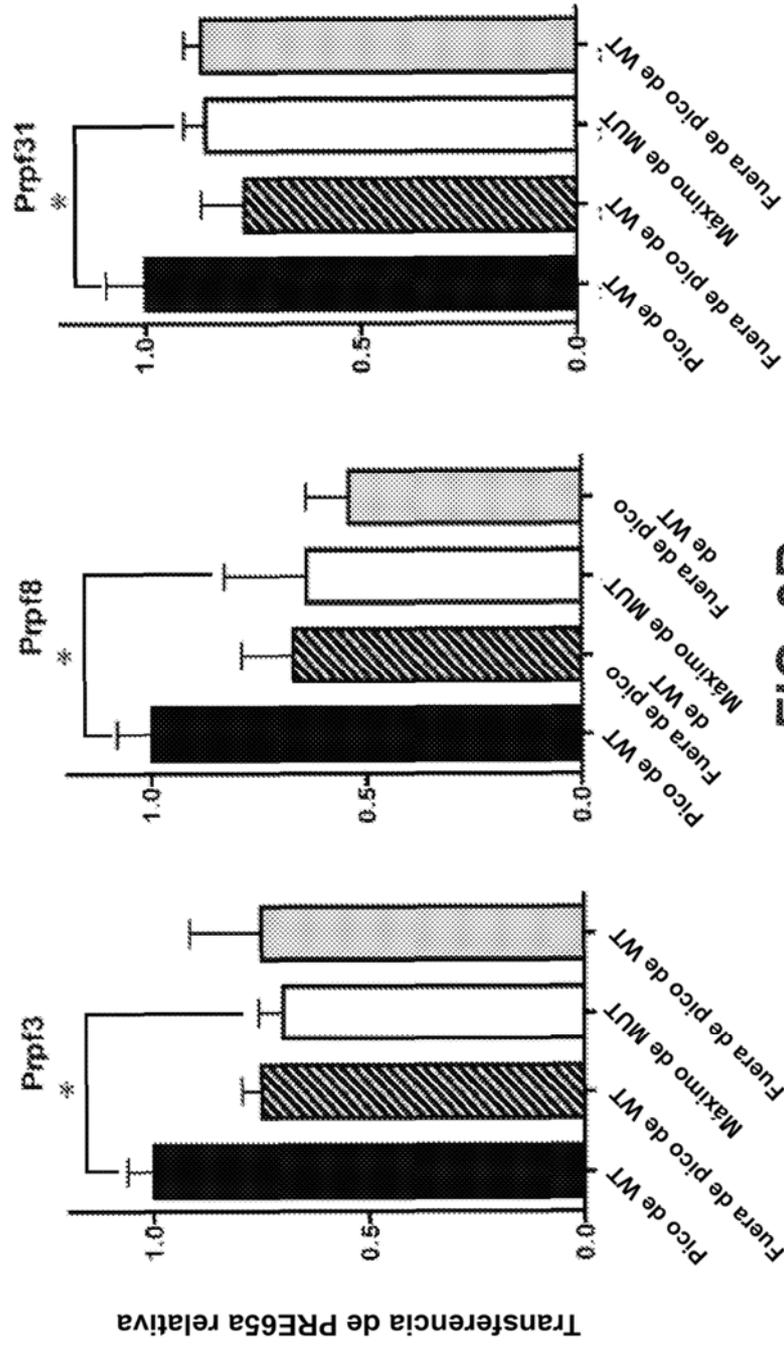
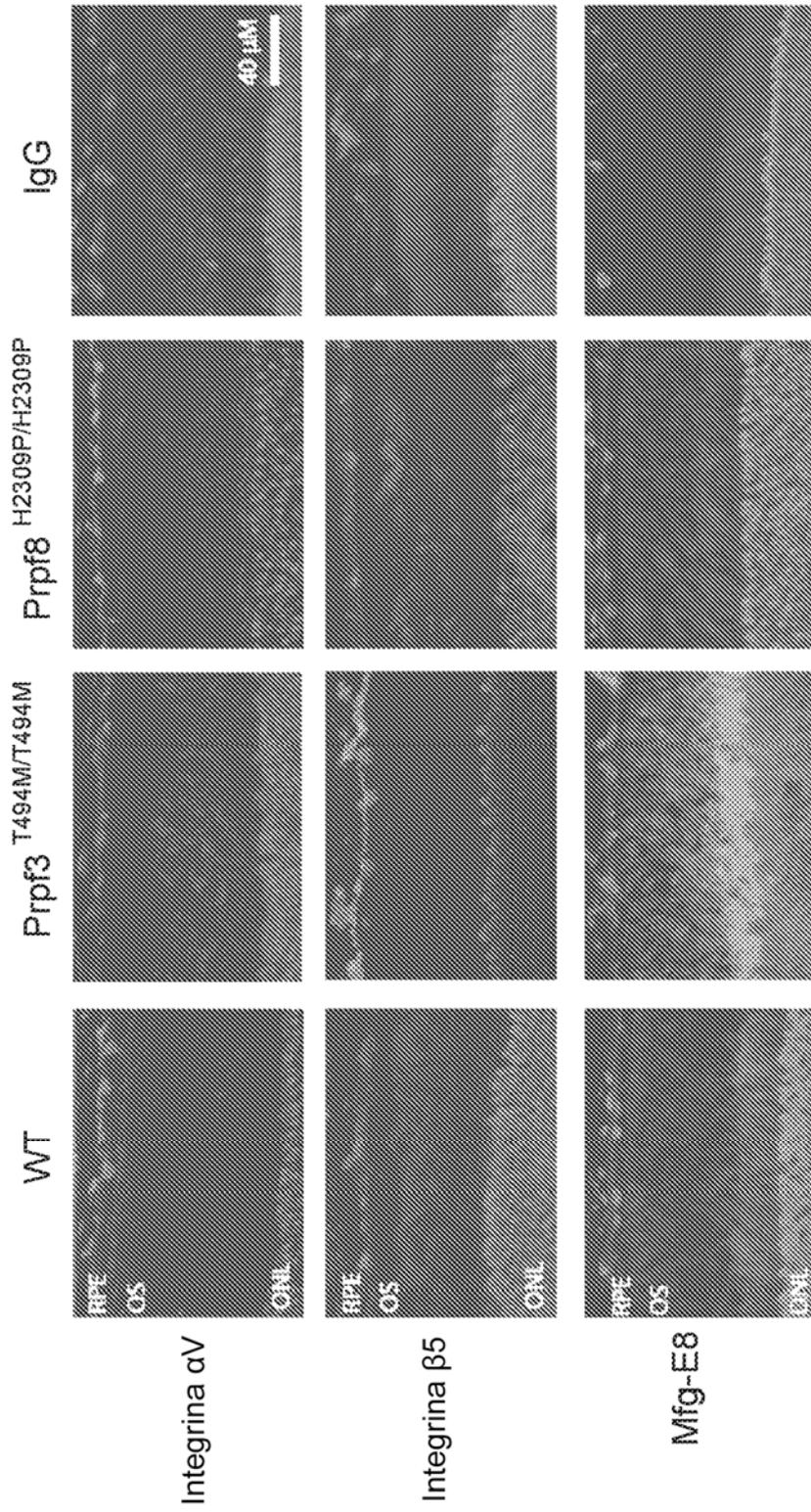
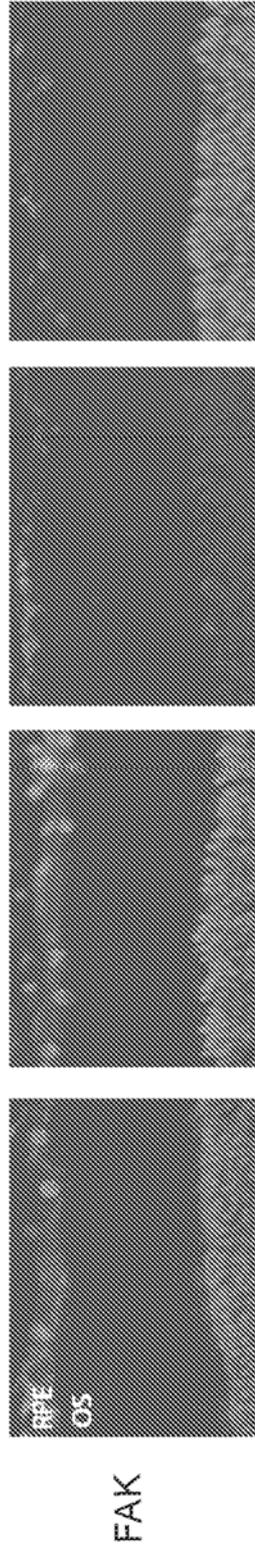


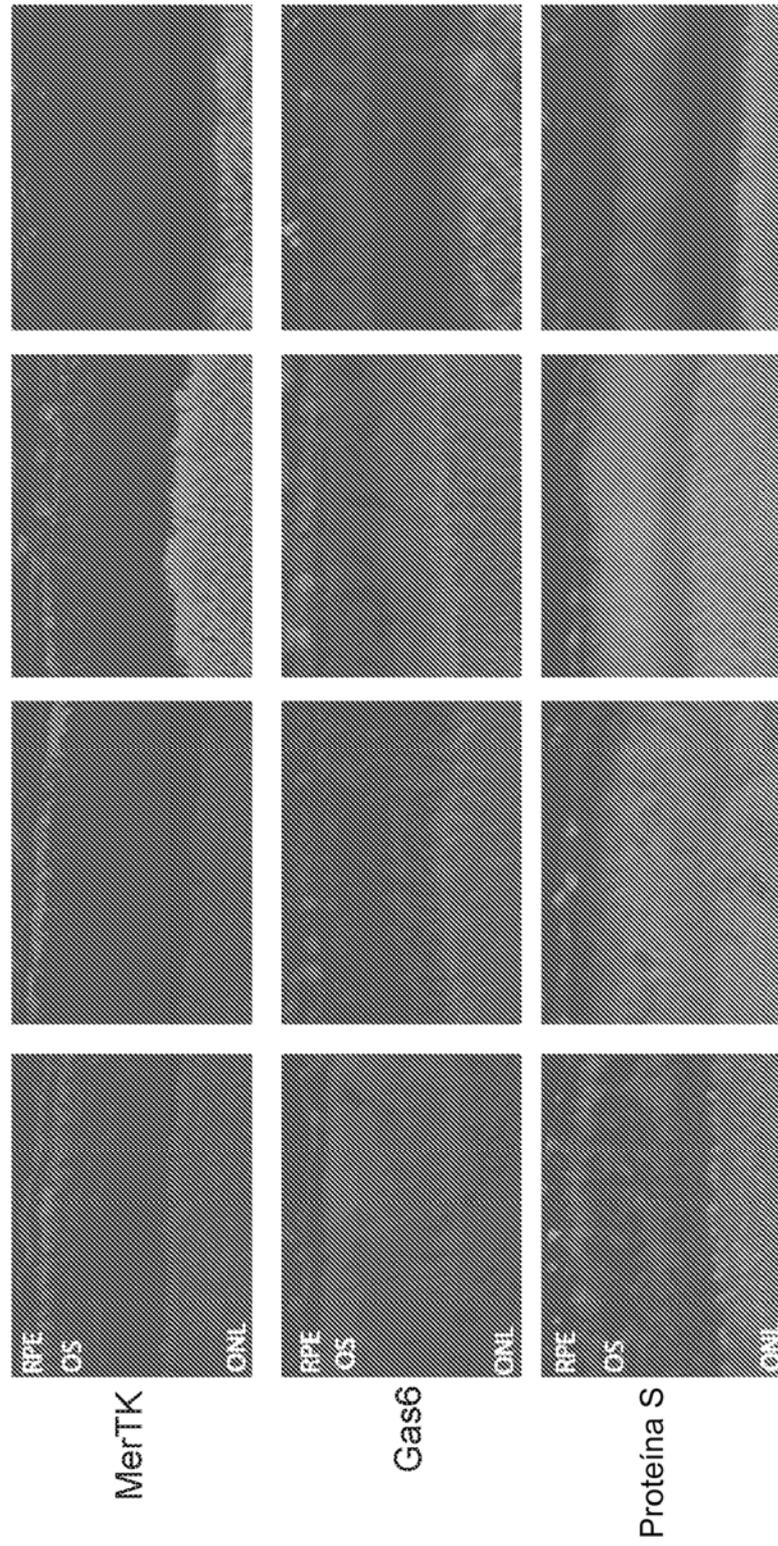
FIG. 3B



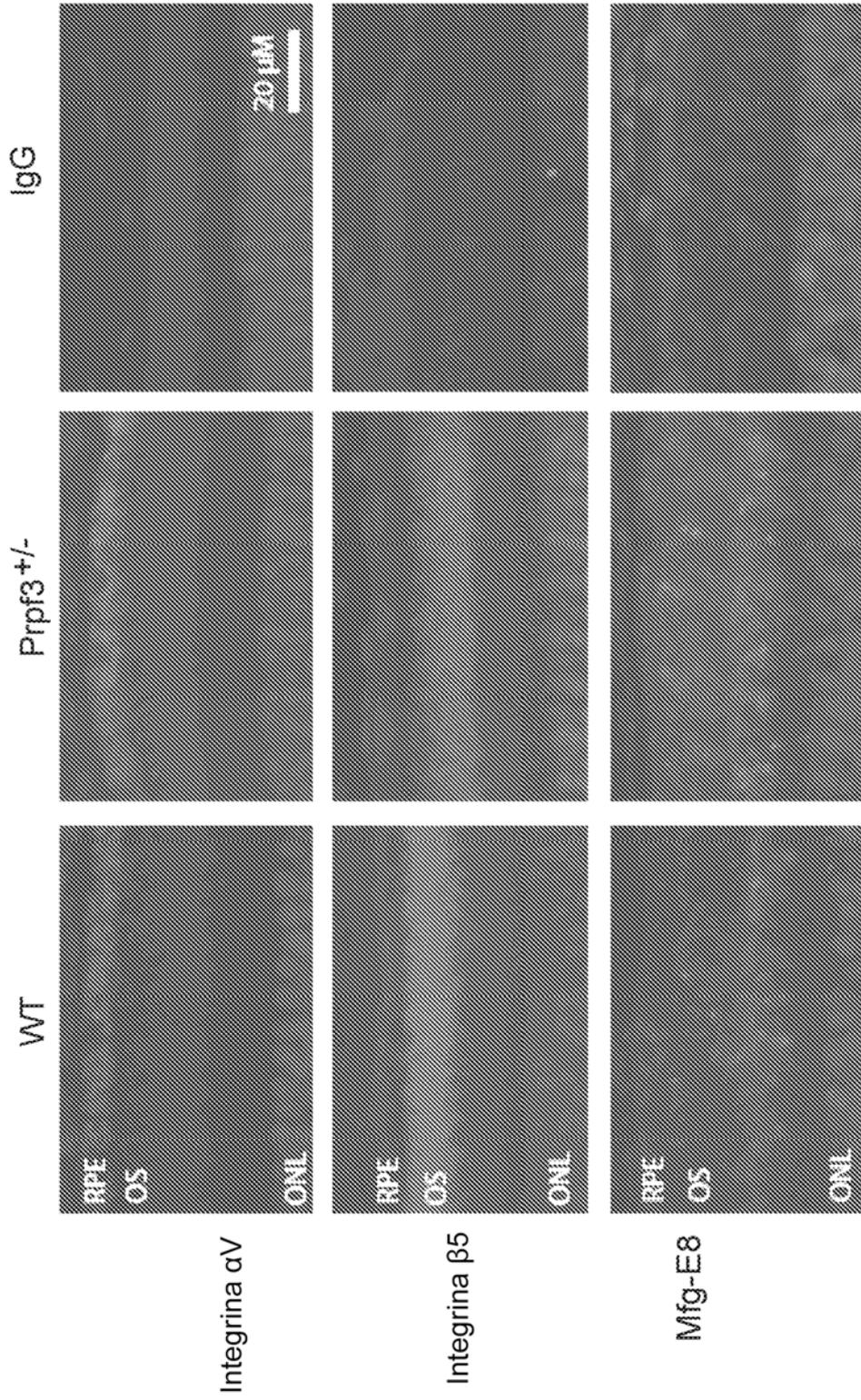
**FIG. 4A**



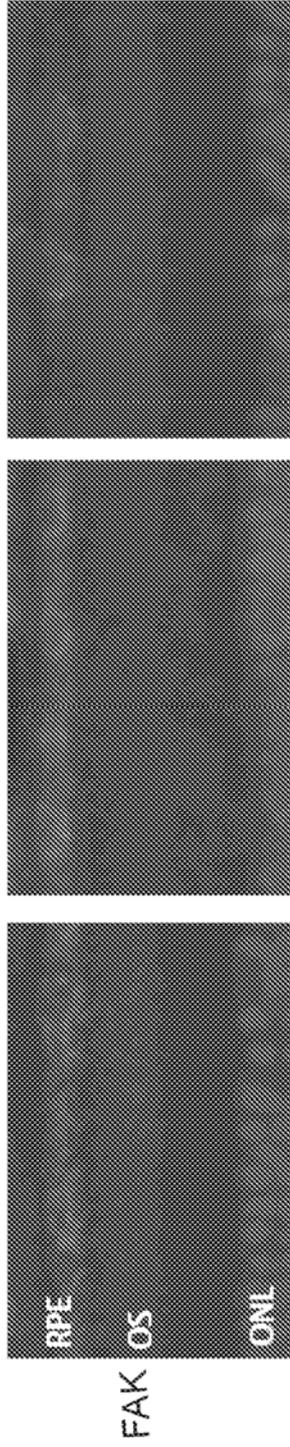
**FIG. 4B**



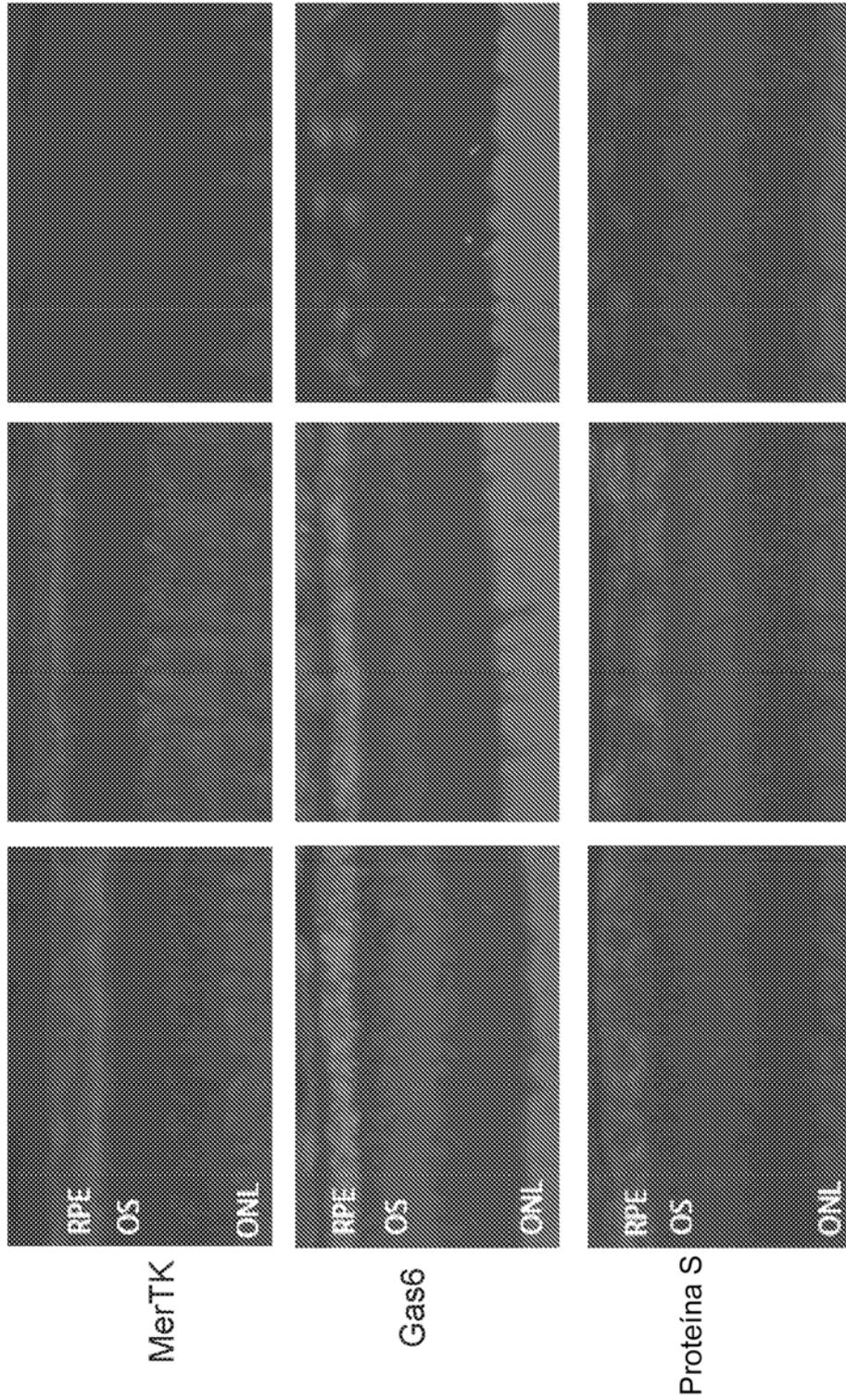
**FIG. 4C**



**FIG. 5A**

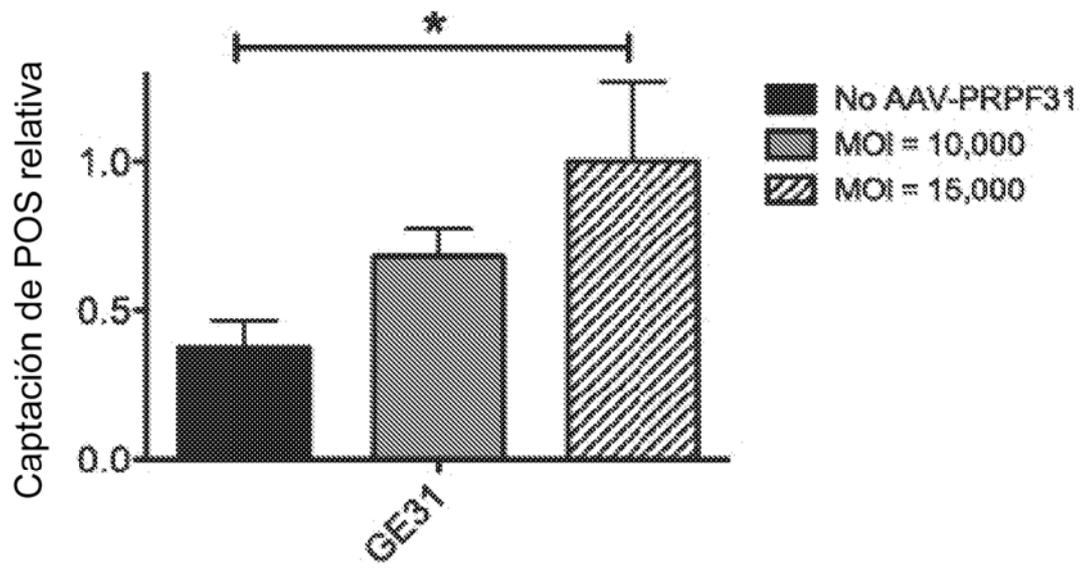


**FIG. 5B**



**FIG. 5C**





**FIG. 7**