

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 638 342**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/86 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2012 PCT/US2012/034413**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.10.2012 WO12145601**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2012 E 12774323 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.06.2017 EP 2699270**

(54) Título: **Viriones de virus adenoasociado con cápside variante y métodos para su uso**

(30) Prioridad:

22.04.2011 US 201161478355 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.10.2017

(73) Titular/es:

THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US

(72) Inventor/es:

SCHAFFER, DAVID V.;
KLIMCZAK, RYAN R.;
KOERBER, JAMES T.;
FLANNERY, JOHN G.;
DALKARA MOUROT, DENIZ;
VISEL, MEIKE y
BYRNE, LEAH C.T.

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 638 342 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

Viriones de virus adenoasociado con cápside variante y métodos para su uso

5 **Declaración según la investigación federalmente financiada**

Esta invención se realizó con apoyo del gobierno bajo las subvenciones Nº EY016994-02 y EY1018241 otorgadas por el "National Eye Institute of the National Institutes of Health". El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

10 **Antecedentes**

Los fotorreceptores son las primeras neuronas en la retina para recibir y procesar la información visual, convirtiendo la radiación electromagnética visible en respuestas hiperpolarizadas a través de fototransducción. La mayoría aplastante de enfermedades de la retina hereditarias dan como resultado la pérdida de estas células, o bien 15 directamente, tal como en mutaciones dominantes que afectan al plegamiento de la proteína rodopsina, o indirectamente, tal como en mutaciones recesivas que afectan a las rutas de reciclado de la retina en el epitelio pigmentario de la retina (EPR).

20 VAA pertenece a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus*, cuyos miembros requieren infección conjunta con un virus auxiliar tal como adenovirus para fomentar la replicación, VAA establece una infección latente en ausencia de un auxiliar. Los viriones están compuestos de una cápside icosaédrica de 25 nm que rodea un genoma de ADN 25 de cadena sencilla de 4,9 kb con dos marcos de lectura abiertos; *rep* y *cap*. El gen *rep* no estructural codifica cuatro proteínas reguladoras esenciales para la replicación vírica, mientras que *cap* codifica tres proteínas estructurales (VP1-3) que se ensamblan en una cubierta de la cápside 60-mer. Esta cápside viral media la capacidad de los vectores de VAA de superar muchas de las barreras biológicas de la transducción viral incluyendo unión a receptor superficial celular, endocitosis, tráfico intracelular, y desempaquetamiento en el núcleo.

Bibliografía

30 Publicación de Patente americana Nº 2005/0053922; Publicación de Patente americana Nº 2009/0202490; Allocca y col. (2007) *J. Virol.* 81:11.372; Boucas y col. (2009) *J. Gene Med.* 11:1.103. Los viriones de VAA se describieron en el documento WO 2010/093784; Petrs-Silva y col., *Molecular Therapy*, vol. 17, nº 3, marzo 2009 páginas 463-471; Park y col., *Gene Therapy*, vol. 16 nº 7, julio 2009, páginas 916-926; y Watanabe y col., *PLoS ONE*, 8 (1), e54146 (2013).

35 **Compendio de la invención**

40 La presente invención proporciona un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr), o una composición farmacéutica que comprende dicho virión, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad ocular en un individuo que lo necesite, en donde la composición comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable, y en el que el virión de virus adenoasociado recombinante comprende: a) una proteína de la cápside de VAA variante, en el que la proteína de la cápside de VAA variante comprende una inserción de un péptido en el bucle GH de la proteína de la cápside en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, en el que la inserción comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de LGETTRP (SEQ ID NO:13), NETITRP (SEQ ID NO:14), 45 KAGQANN (SEQ ID NO:15), KDPKTTN (SEQ ID NO: 16), KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59), y STGKVPN (SEQ ID NO:60); y b) un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de un producto génico; en el que la proteína de la cápside variante infecta una célula retiniana.

50 La presente descripción también presenta un número de otras realizaciones tratadas más adelante en el presente documento. Estas realizaciones de la descripción se proporcionan a modo de referencia a la presente invención, cuyo alcance se define en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

55 La Figura 1 proporciona un modelo tridimensional representativo de VAA2 que contiene un heptámero aleatorio después del aminoácido 587.
 La Figura 2 representa niveles mayores de transducción intravítreo por la variante 7M8 de VAA2 (derecha), en relación con VAA2 (izquierda).
 60 La Figura 3 proporciona imágenes de fluorescencia representativas de cincortes de la retina que muestran la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) que resulta de 7M8 que lleva el gen GFP bajo el control del promotor CAG ubicuo (izquierda) o un promotor de Rho específico a fotorreceptor (derecha).
 La Figura 4 representa células fotorreceptoras GFP⁺ por millón de células retinianas contadas por citometría de flujo, después de transducción por 7M8 o por 7M8 que porta 4 mutaciones de tirosina (7m8.4YF).
 65 La Figura 5 proporciona una secuencia de aminoácidos de VP1 de VAA2 (SEQ ID NO:1).
 La Figura 6 proporciona secuencias de aminoácidos que corresponden a los aminoácidos 570 a 610 de VAA2

(Figura 5) de la proteína VP1 de la cápside de VAA de diversos serotipos de VAA.

Las Figuras 7A-I representan mejoras estructurales en la retina de ratón *Rslh*-/ después de la transferencia génica.

5 Las Figuras 8A-D representan rescate funcional de las ondas A y B de electroretinograma después de la administración del gen de RS1.

Las Figuras 9A-E representan mejoras constantes en el grosor de la retina medido a los 10 meses después del tratamiento con 7m8-rho-RS1.

La Figura 10 proporciona una secuencia de aminoácidos de retinosquisina.

La Figura 11 proporciona una secuencia de aminoácidos del factor neurotrófico derivado del cerebro.

10 La Figura 12 proporciona una secuencia de aminoácidos de EPR65.

Las Figuras 13A-C proporcionan la secuencia de nucleótidos de la construcción 7m8-rho-RS1.

La Figura 14 proporciona una secuencia de aminoácidos de periferina-2.

La Figura 15 proporciona una secuencia de aminoácidos de periferina.

15 La Figura 16 proporciona una secuencia de aminoácidos de la proteína 1 que interactúa con el regulador de la GTPasa de la retinitis pigmentosa.

Las Figuras 17A-C proporcionan un alineamiento de secuencias de aminoácidos de regiones de bucle IV (bucle GH) de la proteína de la cápside de VAA. Los sitios de inserción se muestran en negrita y subrayados.

Las Figuras 18A-C proporcionan un alineamiento de secuencias de aminoácidos de regiones de bucle GH de la proteína de la cápside de VAA, con inserciones peptídicas heterólogas.

20 La Figura 19 proporciona una imagen de fluorescencia del fondo que muestra la expresión de GFP en retina central de primate 9 semanas después de la administración de 7m8 que lleva GFP bajo el control de un promotor de conexina 36.

Definiciones

25 En el presente documento el término “célula retiniana” puede referirse a cualquiera de los tipos celulares que comprenden la retina, tales como células ganglionares de la retina, células amacrinas, células horizontales, células bipolares y células fotorreceptoras incluyendo los bastones y conos, células gliales de Müller, y epitelio pigmentario de la retina.

30 “VAA” es una abreviación para virus adenoasociado, y se puede usar para referirse al propio virus o a sus derivados. El término cubre todos los subtipos y tanto formas de origen natural como recombinantes, excepto cuando se requiere otra cosa. La abreviación “VAAr” se refiere a virus adenoasociado recombinante, también se refiere a un vector de VAA recombinante (o “vector de VAAr”). El término “VAA” incluye VAA tipo 1 (VAA-1), VAA tipo 2 (VAA-2),

35 VAA tipo 3 (VAA-3), VAA tipo 4 (VAA-4), VAA tipo 5 (VAA-5), VAA tipo 6 (VAA-6), VAA tipo 7 (VAA-7), VAA tipo 8 (VAA-8), VAA aviar, VAA bovino, VAA canino, VAA equino, VAA primate, VAA no primate y VAA ovino. “VAA primate” se refiere a VAA que infecta primates, “VAA no primate” se refiere a VAA que infecta mamíferos no primates, “VAA bovino” se refiere a VAA que infecta animales bovinos, etc.

40 Las secuencias genómicas de diversos serotipos de VAA, así como las secuencias de las repeticiones terminales (RT) nativas, proteínas Rep, y subunidades de la cápside son conocidas en la técnica. Tales secuencias se pueden encontrar en la bibliografía o en bases de datos públicas tales como GenBank. Véase, por ejemplo, Números de acceso GenBank NC_002077 (VAA-1), AF063497 (VAA-1), NC_001401 (VAA-2), AF043303 (VAA-2), NC_001729 (VAA-3), NC_001829 (VAA-4), U89790 (VAA-4), NC_006152 (VAA-5), AF513851 (VAA-7), AF513852 (VAA-8), y

45 NC_006261 (VAA-8); cuyas descripciones enseñan secuencias de ácidos nucleicos de VAA y de aminoácidos. Véase también, por ejemplo, Srivastava y col. (1983) *J. Virology* 45:555; Chiorini y col. (1998) *J. Virology* 71:6.823; Chiorini y col. (1999) *J. Virology* 73:1.309; Bantel-Schaal y col. (1999) *J. Virology* 73:939; Xiao y col. (1999) *J. Virology* 73:3.994; Muramatsu y col. (1996) *Virology* 221:208; Shade y col., (1986) *J. Virol.* 58:921; Gao y col. (2002) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99:1.1854; Moris y col. (2004) *Virology* 33:375-383; publicaciones de patente internacional

50 WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; y documento de Patente americana Nº 6.156.303.

El “vector de VAAr” usado en el presente documento se refiere a un vector de VAA que comprende una secuencia de polinucléótidos no de origen VAA (es decir, un polinucleótido heterólogo a VAA), generalmente una secuencia de interés para la transformación genética de una célula. En general, el polinucleótido heterólogo está flanqueado por al menos una, y generalmente por dos, secuencias de repetición terminal invertida (RT) de VAA. El término vector de VAAr abarca tanto partículas de vector de VAAr como plásmidos de vector de VAAr. Un vector de VAAr puede ser o bien de cadena sencilla (VAAcs) o autocomplementario (VAAac).

60 Un “virus VAA” o “partícula vírica VAA” o “partícula vector de VAAr” se refiere a una partícula viral compuesta de al menos una proteína de la cápside de VAA (generalmente por todas las proteínas de la cápside de un VAA tipo natural) y un vector de VAAr de polinucleótido sometido a encapsidación. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido distinto de un genoma de VAA de tipo natural tal como un transgen a administrar a una célula mamífera), generalmente se refiere a una “partícula vector de VAAr” o simplemente un “vector de VAAr”. Por tanto, la producción de partícula de VAAr necesariamente incluye la producción del vector de VAAr, ya que tal vector está contenido dentro de una partícula de VAAr.

"Empaquetamiento" se refiere a una serie de sucesos intracelulares que dan como resultado el ensamblaje y la encapsidación de una partícula de VAA.

5 Los genes "rep" y "cap" de VAA se refieren a secuencias de polinucleótidos codificantes de proteínas de replicación y encapsidación de virus adenoasociados. En el presente documento *rep* y *cap* de VAA se refieren como "genes de empaquetamiento" de VAA.

10 Un "virus auxiliar" para VAA se refiere a un virus que permite que VAA (por ejemplo, VAA de tipo natural) sea replicado y empaquetado por una célula mamífera. En la técnica se conocen una gran diversidad de tales virus auxiliares para VAA, incluyendo adenovirus, herpesvirus y poxvirus tales como vaccinia. El adenovirus abarca un número de diferentes subgrupos, aunque se usa más comúnmente el Adenovirus tipo 5 del subgrupo C. Se conocen numerosos adenovirus de origen humano, mamífero no humano y aviar y están disponibles en depósitos tales como ATCC. Los virus de la familia herpes incluyen, por ejemplo, virus del herpes simple (VHS) y virus de Epstein-Barr (VEB), así como citomegalovirus (CMV) y virus de la pseudorrabia (VPR); los cuales están también disponibles en depósitos tales como ATCC.

15 "Función(es) del virus auxiliar" se refiere a la(s) función(es) codificada(s) en un genoma de virus auxiliar que permite la replicación y empaquetamiento de VAA (junto con otros requerimientos para la replicación y empaquetamiento descritos en el presente documento). Tal como se describe en el presente documento, "función del virus auxiliar" se puede proporcionar en un número de modos, incluyendo proporcionando virus auxiliar o proporcionando, por ejemplo, secuencias de polinucleótidos codificantes de la(s) función(es) requisito(s) para una célula productora en trans. Por ejemplo, un plásmido u otro vector de expresión que comprende secuencias de nucleótidos codificantes de una o más proteínas adenovíricas se somete a transfección en una célula productora junto con un vector de VAAr.

20 25 Un virus o partícula viral "infecciosa" es uno que comprende una cápside viral competentemente ensamblada y es capaz de administrar un componente de polinucleótido en una célula para la cual la especie viral es trópica. El término no necesariamente implica cualquier capacidad de replicación del virus. Los ensayos para recuento de partículas virales infecciosas se describen en otra parte en esta descripción y en la técnica. La infección viral se puede expresar como la relación de partículas virales infecciosas y partículas virales totales. En la técnica se conocen métodos de determinación de la relación de partícula viral infecciosa y partícula viral total. Véase, por ejemplo, Grainger y col. (2005) *Mol. Ther.* 11:S337 (que describe un ensayo de titulación infecciosa de TCID50); y Zolotukhin y col. (1999) *Gene Ther.* 6:973. Véanse también los Ejemplos.

30 35 Un virus "competente para replicación" (por ejemplo, VAA competente para replicación) se refiere a un virus fenotípicamente de tipo natural que es infeccioso, y también es capaz de ser replicado en una célula infectada (es decir, en presencia de un virus auxiliar o funciones de virus auxiliar). En el caso de VAA, la competencia de replicación generalmente requiere la presencia de genes funcionales de empaquetamiento de VAA. En general, los vectores de VAAr descritos en el presente documento son incompetentes para replicación en células mamíferas (especialmente en células humanas) debido a la falta de uno o más genes de empaquetamiento de VAA. Generalmente, tales vectores de VAAr carecen de alguna secuencia de gen de empaquetamiento de VAA para minimizar la posibilidad de que el VAA competente para replicación se genere por recombinación entre genes de empaquetamiento de VAA y un vector de VAAr entrante. En muchas realizaciones, las preparaciones del vector de VAAr descritas en el presente documento son aquellas que contienen pocos si algún VAA competente para replicación (VAAcr, también se refiere como RCA) (por ejemplo, menos de aproximadamente 1 VAAcr por 10^2 partículas de VAAr, menos de aproximadamente 1 VAAcr por 10^4 partículas de VAAr, menos de aproximadamente 1 VAAcr por 10^8 partículas de VAAr, menos de aproximadamente 1 VAAcr por 10^{12} partículas de VAAr, o no VAAcr).

40 45 50 55 55 El término "polinucleótido" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, incluyendo desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y análogos de nucleótido, y se pueden interrumpir por componentes no nucleótidos. Si está presente, se pueden impartir modificaciones a la estructura de nucleótidos antes o después del ensamblaje del polímero. El término polinucleótido, como se usa en el presente documento, se refiere intercambiablemente a moléculas de cadena doble y sencilla. A menos que se especifique o requiera lo contrario, cualquier realización de la invención descrita en el presente documento que es un polinucleótido abarca tanto la forma de doble cadena como cada una de las dos formas complementarias de cadena sencilla conocidas o previstas para componer la forma de doble cadena.

60 65 Las reacciones de hibridación del ácido nucleico se pueden realizar bajo condiciones de diferente "rigor". Condiciones que incrementan el rigor de una reacción de hibridación se conocen ampliamente y están publicadas en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col. "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2º Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989. Por ejemplo, véase la página 7.52 de Sambrook y col. Ejemplos de condiciones relevantes incluyen (en orden de rigor creciente): temperaturas de incubación de 25 °C, 37 °C, 50 °C y 68 °C; concentraciones tampón de 10xSCC, 6xSSC, 1xSSC, 0,1xSSC (donde 1xSCC es NaCl 0,15 M y tampón citrato 15 mM) y sus equivalentes usando otro sistemas tampón; concentraciones de formamida de 0 %, 25 %, 50 %, y 75 %; tiempos de incubación desde 5 minutos a 24 horas; 1, 2 o más etapas de lavado; tiempos de

incubación de lavado de 1, 2 o 15 minutos; y soluciones de lavado de 6xSSC, 1xSSC, 0,1xSSC, o agua desionizada. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosa es la hibridación a 50 °C o más y 0,1xSSC (cloruro de sodio 15 mM/citrato de sodio 1,5 mM). Otro ejemplo de condiciones de hibridación rigurosa es incubación durante la noche a 42 °C en una solución: formamida al 50 %; 1xSSC (NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10 %, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón partido desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 0,1xSSC a aproximadamente 65 °C. Como otro ejemplo, las condiciones de hibridación rigurosa comprenden: hibridación previa durante 8 horas durante la noche a 65 °C en una solución que comprende 6x citrato de potencia sencilla (SSC) (1xSSC es NaCl 0,15 M, citrato de Na 0,015 M; pH 7,0), 5x solución de Denhardt, pirofosfato de sodio al 0,05 % y 100 µg/ml de ADN de esperma de arenque; hibridación durante 18 a 20 horas a 65 °C en una solución que contiene 6xSSC, 1x solución de Denhardt, 100 µg/ml de ARNt de levadura y pirofosfato de sodio al 0,05 %; y lavado de los filtros a 65 °C durante 1 h en una solución que contiene 0,2xSSC y SDS al 0,1 % (dodecil sulfato de sodio).

Condiciones de hibridación rigurosa son condiciones de hibridación que son al menos tan rigurosa como las anteriores condiciones representativas. En la técnica se conocen otras condiciones de hibridación rigurosa y también se pueden emplear para identificar ácidos nucleicos de esta realización particular de la invención.

“T_m” es la temperatura en grados Celsius a la cual el 50 % de un polinucleótido bicatenario hecho de hidrógeno de cadenas complementarias unido en dirección antiparalela por emparejamiento de bases Watson-Crick se disocia en 20 cadenas sencillas bajo condiciones del experimento. T_m se puede predecir según una fórmula estándar, tal como:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log[X^+] + 0,41 (\%G/C) - 0,61 (\%F) - 600/L$$

25 donde [X⁺] es la concentración catiónica (normalmente ion de sodio, Na⁺) en mol/l (%G/C) es el número de restos G y C como porcentaje de restos totales en la doble cadena; (%F) es el porcentaje de formamida en solución (p/vol); y L es el número de nucleótidos en cada cadena de la doble cadena.

30 Un polinucléotido o polipéptido tiene un cierto porcentaje de “identidad de secuencia” a otro polinucléotido o polipéptido, significando que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases o aminoácidos es el mismo cuando se comparan las dos secuencias. La similitud de secuencia se puede determinar en un número de diferentes maneras. Para determinar la identidad de secuencia, las secuencias se pueden alinear usando los métodos y programas informáticos, incluyendo BLAST, disponibles en internet en ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/. Otro algoritmo de alineamiento es FASTA, disponible en los paquetes del “Genetics Computing Group” (GCG), de Madison, Wisconsin, USA, una sucursal completamente admitida del “Oxford Molecular Group”, Inc. Otras técnicas para alineamiento están 35 descritas en *Methods in Enzymology*, vol. 266: “Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis” (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., una división de Harcourt Brace & Co., San Diego, California, USA. Un interés particular son los programas de alineamiento que permiten huecos (*gaps*) en la secuencia. El Smith-Waterman es un tipo de algoritmo que permite huecos en alineamientos de secuencia. Véase *Meth. Mol. Biol.* 70:173-187 (1997). También, el programa GAP que usa el método de alineamiento de Needleman y Wunsch se puede utilizar para 40 alinear secuencias. Véase *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970).

45 De interés es el programa BestFit que usa el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981)) para determinar la identidad de secuencia. La penalización de la generación de hueco generalmente oscilará desde 1 a 5, normalmente 2 a 4 y en muchas realizaciones será 3. La penalización de extensión de hueco generalmente oscilará desde aproximadamente 0,01 a 0,20 y en muchos ejemplos será de 0,10. El programa tiene parámetros por defecto determinados por las secuencias introducidas a comparar. Preferentemente, la identidad de secuencia se determina usando los parámetros por defecto determinados por el 50 programa. Este programa está disponible también en el paquete de Genetics Computing Group (GCG), de Madison, Wisconsin, USA.

55 Otro programa de interés es el algoritmo FastDB, FastDB está descrito en “Current Methods in Sequence Comparison and Analysis, Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications”, pp. 127-149, 1988, Alan R. Liss, Inc. La identidad de porcentaje de secuencia se calcula por FastDB basándose en los siguientes parámetros:

Penalización de desparejamiento: 1,00;
 Penalización de hueco: 1,00;
 Penalización de tamaño de hueco: 0,33; y
 Penalización de unión: 30,0.

60 Un “gen” se refiere a un polinucleótido que contiene al menos un marco de lectura abierto que es capaz de codificar una proteína particular después de ser sometido a transcripción y traducción.

65 Un “producto genético” es una molécula que resulta de la expresión de un gen particular. Los productos genéticos incluyen, por ejemplo, un polipéptido, un aptámero, un ARN interferente, un ARNm y similares.

- Un “ARN interferente corto” o “interferente pequeño” o ARNic es un ARN bicatenario de nucleótidos que se dirige a un gen de interés (un “gen diana”). Un “ARN bicatenario” se refiere a la estructura formada por el emparejamiento complementario entre dos regiones de una molécula de ARN. ARNic está “dirigido” a un gen en el que la secuencia de nucleótidos de la parte bicatenaria del ARNic es complementaria a una secuencia de nucleótidos del gen dirigido.
- 5 En algunas realizaciones, la longitud de la doble cadena de ARNic es menor de 30 nucleótidos. En algunas realizaciones, la doble cadena puede ser de 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 o 10 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, la longitud de la doble cadena es de 19 a 25 nucleótidos de longitud. La parte de ARN bicatenario del ARNic puede ser parte de una estructura horquilla. Además de la parte bicatenaria, la estructura horquilla puede contener una parte bucle colocada entre las dos secuencias que forman la doble cadena. El bucle puede variar en longitud. En algunas realizaciones el bucle es de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 nucleótidos de longitud. La estructura horquilla también puede contener partes salientes 3' o 5'. En algunas realizaciones, el saliente es un saliente 3' o 5' de 0, 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de longitud.
- 10 Un “ARN de horquilla corta” o ARNhC, es una construcción de polinucleótido que se puede hacer para expresar un ARN interferente tal como ARNic.
- 15 “Recombinante”, cuando se aplica a un polinucleótido significa que el polinucleótido es el producto de diversas combinaciones de etapas de clonación, restricción o ligación, y otros procedimientos que dan como resultado una construcción que es distinta de un polinucleótido encontrado en la naturaleza. Un virus recombinante es una partícula viral que comprende un polinucleótido recombinante. Los términos incluyen respectivamente réplicas de la construcción de polinucleótido original y progenie de la construcción de virus original.
- 20 Un “elemento control” o “secuencia control” es una secuencia de nucleótidos implicada en una interacción de moléculas que contribuyen a la regulación funcional de un polinucleótido, incluyendo replicación, duplicación, transcripción, ayuste (*splicing*), traducción o degradación del polinucleótido. La regulación puede afectar a la frecuencia, velocidad o especificidad del proceso, y puede ser favorecedora o inhibidora en la naturaleza. Los elementos control conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, secuencias reguladoras transcripcionales tales como promotores o potenciadores. Un promotor es una región de ADN capaz bajo ciertas condiciones de unirse a ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una región codificante normalmente localizada corriente abajo (en la dirección 3') desde el promotor.
- 25 Un “operativamente ligado” o “operablemente ligado” se refiere a una yuxtaposición de elementos genéticos, en la que los elementos están en una relación que los permite funcionar de la manera esperada. Por ejemplo, un promotor está operativamente ligado a una región codificante se el promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificante. Puede haber restos intermedios entre el promotor y la región codificante siempre que se mantenga esta relación funcional.
- 30 Un “vector de expresión” es un vector que comprende una región que codifica un polipéptido de interés, y se usa para efectuar la expresión de la proteína en una célula diana prevista. Un vector de expresión también puede comprender elementos control operativamente ligados a la región codificante para facilitar la expresión de la proteína en la diana. La combinación de elementos control y un gen o genes a los cuales están operativamente ligados para la expresión a veces se refiere como un “casete de expresión”, un gran número de los cuales se conocen y están disponibles en la técnica o se pueden construir fácilmente a partir de los componentes que están disponibles en la técnica.
- 35 Un “heterólogo” significa derivado de una entidad genéticamente distinta del resto de la entidad con la cual se compara. Por ejemplo, un polinucleótido introducido por técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una especie diferente es un polinucleótido heterólogo. Un promotor separado de su secuencia codificante nativa y operativamente ligado a una secuencia codificante con la cual no se encuentra ligado de manera natural es un promotor heterólogo. Por tanto, por ejemplo, un VAAr que incluye un ácido nucleico heterólogo codificante de un producto génico heterólogo es un VAAr que incluye un ácido nucleico no incluido normalmente en un VAA de origen natural, de tipo natural, y el producto génico heterólogo codificado es un producto génico no codificado normalmente por un VAA de tipo natural, de origen natural.
- 40 Un “alteración genética” y “modificación genética” (y variantes gramaticales de los mismos), se usan intercambiablemente en el presente documento para referirse a un proceso en el que un elemento genético (por ejemplo, un polinucleótido) se introduce en una célula distinta por mitosis o meiosis. El elemento puede ser heterólogo a la célula, o puede ser una copia adicional o versión mejorada de un elemento ya presente en la célula. La alteración genética se puede efectuar, por ejemplo, sometiendo a transfección una célula con un plásmido recombinante u otro polinucleótido a través de cualquier proceso conocido en la técnica, tal como electroporación, precipitación de fosfato de calcio, o poniendo en contacto con un complejo de polinucleótido-liposoma. La alteración genética también se puede efectuar, por ejemplo, por transducción o infección con un virus de ADN o ARN o vector viral. Generalmente, el elemento genético se introduce en un cromosoma o minicromosoma en la célula; pero cualquier alteración que cambia el fenotipo y/o genotipo de la célula y su progenie está incluido en este término.
- 45 Se dice que una célula se altera, somete a transducción, modifica genéticamente o transforma con una secuencia
- 50
- 55
- 60
- 65

genética "de manera estable" si la secuencia puede realizar su función durante el cultivo prolongado de la célula *in vitro*. Generalmente, dicha célula está "hereditariamente" alterada (genéticamente modificada) en el sentido de que se introduce una alteración genética que es también heredable por la progenie de la célula alterada.

5 Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan intercambiablemente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. Los términos también incluyen un polímero de aminoácidos que se ha modificado; por ejemplo, formación de enlace disulfuro, glicosilación, lipidación, fosforilación 10 o conjugación con un componente de marcación. Los polipéptidos tales como polipéptidos antiangiogénicos, polipéptidos neuroprotectores y similares, cuando se tratan en el contexto de administración de un producto génico a un sujeto mamífero, y composiciones de los mismos, se refieren al respectivo polipéptido intacto, o cualquier fragmento o derivado genéticamente modificado del mismo, que conserva la función bioquímica deseada de la 15 proteína intacta. Igualmente, las referencias a ácidos nucleicos codificantes de polipéptidos antiangiogénicos, ácidos nucleicos codificantes de polipéptidos neuroprotectores, y otros ácidos nucleicos para su uso en la administración de un producto génico a un sujeto mamífero (que pueden referir como "transgenes" a administrar a una célula receptora), incluyen polinucleótidos codificantes del polipéptido intacto o cualquier fragmento o derivado genéticamente modificado que procesa la función bioquímica deseada.

20 Un plásmido, ácido nucleico, vector, virus, virión, célula hospedadora u otra sustancia "aislada" se refiere a una preparación de sustancia desprovista de al menos alguno de los otros componentes que también pueden estar presentes donde la sustancia o una sustancia similar se da de manera natural o está inicialmente preparada de la misma. Por tanto, por ejemplo, una sustancia aislada se puede preparar usando una técnica de purificación para enriquecerla a partir de una mezcla fuente. El enriquecimiento se puede medir sobre una base absoluta, tal como peso por volumen de solución, o se puede medir en relación con una segunda sustancia potencialmente interferente 25 presente en la mezcla fuente. Los enriquecimientos crecientes de las realizaciones de esta descripción son cada vez más aislados. Un plásmido, ácido nucleico, vector, virus, célula hospedadora u otra sustancia aislada está en algunas realizaciones purificadas, por ejemplo, desde aproximadamente 80 % a aproximadamente 90 % puro, al menos aproximadamente 90 % puro, al menos 95 % puro, al menos 98 % puro, o al menos aproximadamente 99 % o más, puro.

30 Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar" y similares, se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completamente o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento", como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un humano, e incluye: (a) prevenir la enfermedad de que se de en un sujeto el cual puede estar predispuesto a la enfermedad o en riesgo de adquirir la enfermedad, pero aún no se ha diagnosticado que la tiene; (b) inhibir la enfermedad, es decir, frenar su desarrollo; y (c) aliviar la enfermedad, es decir, causar regresión de la enfermedad.

40 Los términos "individual", "hospedadora", "sujeto" y "paciente" se usan intercambiablemente en el presente documento, y se refieren a un mamífero, incluyendo, pero no limitándose a, primates humanos y no humanos, incluido simios y humanos; animales mamíferos de deporte (por ejemplo, caballos), animales mamíferos de granja (por ejemplo, ovejas, cabras, etc.); mamíferos mascotas (perros, gatos, etc.); y roedores (por ejemplo, ratones, ratas, etc.).

45 Antes de que se describa más la presente invención, hay que entender que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que tales, por supuesto, pueden variar. También hay que entender que la terminología usada en el presente documento es con el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, puesto que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

50 Cuando se proporciona un intervalo, se entiende que cada valor intermedio, al decimal de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor señalado o intermedio en ese intervalo señalado, está incluido dentro de la invención. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños pueden estar incluidos independientemente en los 55 intervalos más pequeños, y también están incluidos dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo señalado. Cuando el intervalo señalado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de aquellos límites incluidos también están incluidos en la invención.

60 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque también se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen más adelante. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento revelan y describen los métodos y/o materiales con respecto a las publicaciones en las que se citan.

65 Se debe indicar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones anexas, las formas del

- singular "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes del plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un virión de VAA recombinante" incluye una pluralidad de tales viriones y la referencia a "la célula fotorreceptora" incluye referencia a una o más células fotorreceptoras y equivalentes de la misma conocidos por los expertos en la técnica, etc. Además, se indica que las reivindicaciones se pueden redactar para excluir cualquier elemento opcional. De por sí, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de tal terminología exclusiva como "solo" "solamente" y similares en relación con la relación de los elementos de la reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".
- 5 Se aprecia que ciertas características de la invención, las cuales, para mayor claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar en combinación en una realización única. A la inversa, diversas características de la invención, las cuales, para mayor brevedad, se describen en el contexto de una realización única, también se pueden proporcionar por separado en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las realizaciones que conciernen a la invención son abarcadas específicamente por la presente invención y se describen en el presente documento justo como si cada una y todas las combinaciones estuvieran 10 descritas individualmente y explícitamente. Además, todas las subcombinaciones de las diversas realizaciones y elementos de las mismas también están abarcados por la presente invención y están descritos en el presente documento justo como si cada una y todas tales subcombinaciones estuvieran individualmente y explícitamente descritas en el presente documento.
- 15 20 Las publicaciones tratadas en el presente documento se proporcionan solamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente aplicación. Nada en el presente documento es ser interpretado como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder tal publicación debido a la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que 25 pueden necesitar ser confirmadas independientemente.
- 25 Descripción detallada**
- 30 La presente descripción proporciona viriones de virus adenoasociados (VAA) con proteína de cápside alterada, donde los viriones de VAA presentan mayor infectividad de una célula retiniana, cuando se administran por inyección intravítreo, en comparación con VAA de tipo natural cuando se administra por inyección intravítreo. La presente descripción proporciona además métodos de administración de un producto génico a una célula retiniana en un individuo, y métodos de tratamiento de enfermedad ocular.
- 35 La célula retiniana puede ser un fotorreceptor (por ejemplo, bastones; conos), una célula ganglionar de la retina (CGR), una célula de Müller (una célula glial de Müller), una célula bipolar, una célula amacrina, una célula horizontal, o una célula de epitelio pigmentario de la retina (EPR).
- POLIPÉPTIDOS DE PROTEÍNA DE LA CÁPSIDE DE VAA VARIANTE**
- 40 La presente descripción proporciona una proteína de la cápside de VAA variante, donde la proteína de la cápside de VAA variante comprende una inserción de desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos en un sitio de inserción en el bucle GH o bucle IV de la proteína de la cápside, en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, y donde la proteína de la cápside variante, cuando está 45 presente en un virión de VAA, confiere infectividad incrementada de una célula retiniana en comparación con la infectividad de la célula retiniana por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental. En algunos casos, la célula retiniana es una célula fotorreceptora (por ejemplo, bastones; conos). En otros casos, la célula retiniana es una CGR. En otros casos, la célula retiniana es una célula de EPR. En otros casos, la célula retiniana es una célula de Müller. Otras células retinianas incluyen células amacrinas, células bipolares y células horizontales. En el presente documento, una "inserción de desde aproximadamente 5 50 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos" también se refiere como una "inserción peptídica" (por ejemplo, una inserción peptídica heteróloga). Una "correspondiente proteína de la cápside de VAA parental" se refiere a una proteína de la cápside de VAA del mismo serotipo de VAA, sin la inserción peptídica.
- 55 El sitio de inserción está en el bucle GH, o bucle IV, de la proteína de la cápside de VAA, por ejemplo, en una parte accesible por disolvente del bucle GH, o bucle IV, de la proteína de la cápside de VAA. Para el bucle GH/bucle IV de la cápside de VAA, véase, por ejemplo, Vliet y col. (2006) *Mol. Ther.* 14:809; Padron y col. (2005) *J. Virol.* 79:5.047; y Shen y col. (2007) *Mol. Ther.* 15:1.955. Por ejemplo, el sitio de inserción puede estar dentro de los aminoácidos 411 a 650 de una proteína de la cápside de VAA, como se representa en las Figuras 17A y 17B. Por ejemplo, el sitio de inserción puede estar dentro de los aminoácidos 570 a 611 de VAA2, dentro de los aminoácidos 571 a 612 de VAA1, dentro de los aminoácidos 560 a 601 de VAA5, dentro de los aminoácidos 571 a 612 de VAA6, dentro de los 60 aminoácidos 572 a 613 de VAA7, dentro de los aminoácidos 573 a 614 de VAA8, dentro de los aminoácidos 571 a 612 de VAA9, o dentro de los aminoácidos 573 a 614 de VAA10, como se representa en la Figura 6.
- 65 En algunos casos, desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos están insertados en un sitio de inserción en el bucle GH o bucle IV de la proteína de la cápside en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental. Por ejemplo, el sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 587 a

588 de VAA2, o las correspondientes posiciones de la subunidad de la cápside de otro serotipo de VAA. Se debería indicar que el sitio de inserción 587/588 se basa en una proteína de la cápside de VAA2. Desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos pueden estar insertados en un sitio correspondiente en un serotipo de VAA distinto de VAA2 (por ejemplo, VAA8, VAA9, etc.). Los expertos en la técnica sabrán, basándose en una 5 comparación de las secuencias de aminoácidos de proteínas de la cápside de diversos serotipos de VAA, donde un sitio de inserción "correspondiente a los aminoácidos 587 a 588 de VAA2" sería una proteína de la cápside de cualquier serotipo de VAA dado. Las secuencias que corresponden a los aminoácidos 570 a 611 de la proteína de la cápside VP1 de VAA2 (véase Figura 5) en diversos serotipos de VAA se muestran en la Figura 6. Véase, por ejemplo, Nº de Acceso de GenBank NP_049542 para VAA1; Nº de Acceso de GenBank AAD13756 para VAA5; Nº 10 de Acceso de GenBank AAB95459 para VAA6; Nº de Acceso de GenBank YP_077178 para VAA7; Nº de Acceso de GenBank YP_077180 para VAA8; Nº de Acceso de GenBank AAS99264 para VAA9 y Nº de Acceso de GenBank AAT46337 para VAA10.

15 En algunas realizaciones, el sitio de inserción es un sitio de inserción único entre dos aminoácidos adyacentes localizados entre los aminoácidos 570 a 614 de VP1 de cualquier serotipo de VAA, por ejemplo, el sitio de inserción está entre dos aminoácidos adyacentes localizados en los aminoácidos 570 a 610, aminoácidos 580 a 600, aminoácidos 570 a 575, aminoácidos 575 a 580, aminoácidos 580 a 585, aminoácidos 585 a 590, aminoácidos 590 a 600, o aminoácidos 600 a 614, de VP1 de cualquier serotipo de VAA o variante. Por ejemplo, el sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 580 y 581, aminoácidos 581 y 582, aminoácidos 583 y 584, aminoácidos 584 y 20 585, aminoácidos 585 y 586, aminoácidos 586 y 587, aminoácidos 587 y 588, aminoácidos 588 y 589, o aminoácidos 589 y 590. El sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 575 y 576, aminoácidos 576 y 577, aminoácidos 577 y 578, aminoácidos 578 y 579, o aminoácidos 579 y 580. El sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 590 y 591, aminoácidos 591 y 592, aminoácidos 592 y 593, aminoácidos 593 y 594, aminoácidos 594 y 25 595, aminoácidos 595 y 596, aminoácidos 596 y 597, aminoácidos 597 y 598, aminoácidos 598 y 599, o aminoácidos 599 y 600.

Por ejemplo, el sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 587 y 588 de VAA2, entre los aminoácidos 590 y 591 de VAA1, entre los aminoácidos 575 y 576 de VAA5, entre los aminoácidos 590 y 591 de VAA6, entre los aminoácidos 589 y 590 de VAA7, entre los aminoácidos 590 y 591 de VAA8, entre los aminoácidos 588 y 589 de 30 VAA9, o entre los aminoácidos 588 y 589 de VAA10.

Como otro ejemplo, el sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 450 y 460 de una proteína de la cápside de VAA, como se muestra en la Figura 17A. Por ejemplo, el sitio de inserción puede estar en (por ejemplo, inmediatamente N-terminal a) el aminoácido 453 de VAA 2, en el aminoácido 454 de VAA1, en el aminoácido 454 de 35 VAA6, en el aminoácido 456 de VAA7, en el aminoácido 456 de VAA8, en el aminoácido 454 de VAA9, o en el aminoácido 456 de VAA10, como se muestra en la Figura 17A.

En algunas realizaciones, una proteína de la cápside objeto incluye un bucle GH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90%, al menos 40 95%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100%, de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta en la Figura 18A-C.

Péptidos de inserción

45 Como se indicó anteriormente, un péptido de desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos de longitud está insertado en el bucle GH de una cápside de VAA. El péptido de inserción tiene una longitud de 5 aminoácidos, 6 aminoácidos, 7 aminoácidos, 8 aminoácidos, 9 aminoácidos, 10 aminoácidos o 11 aminoácidos.

50 El péptido de inserción puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las fórmulas expuestas a continuación.

Por ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el sitio de inserción es de Fórmula I:

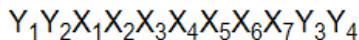
55
$$Y_1 Y_2 X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 Y_3 Y_4$$

donde:

60 cada uno de Y_1-Y_4 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser, y Thr;
 X_1 , si está presente, se selecciona de Leu, Asn, y Lys;
 X_2 se selecciona de Gly, Glu, Ala, y Asp;
 X_3 se selecciona de Glu, Thr, Gly, y Pro;
 X_4 se selecciona de Thr, Ile, Gln, y Lys;
65 X_5 se selecciona de Thr y Ala;

X₆ se selecciona de Arg, Asn, y Thr;
 X₇, si está presente, se selecciona de Pro y Asn.

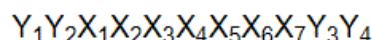
Como otro ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el péptido de inserción es de Fórmula IIa:



donde:

- 10 cada uno de Y₁-Y₄, si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser y Thr;
 cada uno de X₁-X₄ es cualquier aminoácido;
 X₅ es Thr;
 X₆ es Arg; y
 15 X₇ es Pro.

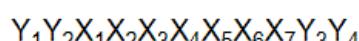
Como otro ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el péptido de inserción es de Fórmula IIb:



donde:

- 20 cada uno de Y₁-Y₄, si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser y Thr;
 25 X₁, si está presente, se selecciona de Leu y Asn;
 X₂, si está presente, se selecciona de Gly y Glu;
 X₃ se selecciona de Glu y Thr;
 X₄ se selecciona de Thr y Ile;
 X₅ es Thr;
 30 X₆ es Arg; y
 X₇ es Pro.

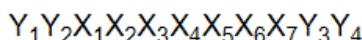
Como otro ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el péptido de inserción es de Fórmula III:



donde:

- 40 cada uno de Y₁-Y₄, si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser y Thr;
 X₁, si está presente, es Lys;
 X₂ se selecciona de Ala y Asp;
 X₃ se selecciona de Gly y Pro;
 X₄ se selecciona de Gln y Lys;
 45 X₅ se selecciona de Thr y Ala;
 X₆ se selecciona de Asn y Thr;
 X₇, si está presente, es Asn.

Como otro ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el péptido de inserción es de Fórmula IV:



donde:

- 55 cada uno de Y₁-Y₄, si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser y Thr;
 X₁, si está presente, es un aminoácido positivamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de Leu, Asn, Arg, Ala, Ser y Lys;
 X₂ es un aminoácido negativamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de Gly, Glu, Ala, Val, Thr y Asp;
 60 X₃ es un aminoácido negativamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de Glu, Thr, Gly, Asp o Pro;

X₄ se selecciona de Thr, Ile, Gly, Lys, Asp y Gln;

X₅ es un aminoácido polar, un alcohol (un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo libre), o un aminoácido hidrófobo; o se selecciona de Thr, Ser, Val y Ala;

5 X₆ es un aminoácido positivamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de Arg, Val, Lys, Pro, Thr y Asn; y

X₇, si está presente, es un aminoácido positivamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de Pro, Gly, Phe, Asn y Arg.

10 Como ejemplos no limitantes, el péptido de inserción puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de LGETTRP (SEQ ID NO:13), NETITRP (SEQ ID NO:14), KAGQANN (SEQ ID NO:15), KDPKTTN (SEQ ID NO:16), KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59), y STGKVPN (SEQ ID NO:60).

15 En algunos casos, el péptido de inserción tiene desde 1 a 4 aminoácidos espaciadores (Y₁-Y₄) en el terminal amino y/o en el terminal carboxilo de una cualquiera de LGETTRP (SEQ ID NO:13), NETITRP (SEQ ID NO:14), KAGQANN (SEQ ID NO:15), KDPKTTN (SEQ ID NO:16), KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59), y STGKVPN (SEQ ID NO:60). Los aminoácidos espaciadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, leucina, alanina, glicina y serina.

20 20 Por ejemplo, en algunos casos, un péptido de inserción tiene una de las siguientes secuencias de aminoácidos: LALGETTRPA (SEQ ID NO:45); LANETITRPA (SEQ ID NO:46), LAKAGQANNA (SEQ ID NO:47), LAKDPKTTNA (SEQ ID NO:48), LAKDTDTTRA (SEQ ID NO:61), LARAGGSVGA (SEQ ID NO:62), LVAADTTKFA (SEQ ID NO:63), y LASTGKVPNA (SEQ ID NO:64). Como otro ejemplo, en algunos casos, un péptido de inserción tiene una de las siguientes secuencias de aminoácidos: AALGETTRPA (SEQ ID NO:49); AANETITRPA (SEQ ID NO:50), 25 AAKAGQANNA (SEQ ID NO:51), y AAKDPKTTNA (SEQ ID NO:52). Como otro ejemplo más, en algunos casos, el péptido de inserción tiene una de las siguientes secuencias de aminoácidos: GLGETTRPA (SEQ ID NO:53); GNETITRPA (SEQ ID NO:54), GKAGQANNA (SEQ ID NO:55), y GKDPKTTNA (SEQ ID NO:56). Como otro ejemplo, en algunos casos, un péptido de inserción comprende una de KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59), y STGKVPN (SEQ ID NO:60), flanqueada en el terminal C por AA y en el terminal N por A; o comprende una de KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59), y STGKVPN (SEQ ID NO:60) flanqueada en el terminal C por G y en el terminal N por A.

35 En algunas realizaciones, una cápside de VAA variante objeto no incluye ninguna otra sustitución, inserción o delección de aminoácido, aparte de una inserción de desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos en el bucle GH o bucle IV en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental. En otras realizaciones, una cápside de VAA variante objeto incluye inserciones, delecciones o sustituciones de desde 1 a aproximadamente 25 aminoácidos, en comparación con la proteína de la cápside de VAA parental, además de una inserción de desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos en el bucle GH o bucle IV en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental. Por ejemplo, en algunas 40 realizaciones, un cápside de VAA variante objeto incluye inserciones, delecciones o sustituciones de desde 1 a aproximadamente 5, desde aproximadamente 5 a aproximadamente 10, desde aproximadamente 10 a aproximadamente 15, desde aproximadamente 15 a aproximadamente 20, o desde aproximadamente 20 a aproximadamente 25 aminoácidos, en comparación con la proteína de la cápside de VAA parental, además de una inserción de desde 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos en el bucle GH o bucle IV en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.

45 En algunas realizaciones, un polipéptido de la cápside variante objeto no incluye una, dos, tres o cuatro, de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Y273F, Y444F, Y500F y Y730F.

50 En algunas realizaciones, un polipéptido de la cápside variante objeto comprende, además de un péptido de inserción anteriormente descrito, uno, dos, tres o cuatro de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Y273F, Y444F, Y500F y Y730F.

55 En algunas realizaciones, un polipéptido de la cápside de VAA variante es una cápside químérica, por ejemplo, la cápside comprende una parte de una cápside de VAA de un primer serotipo de VAA y una parte de una cápside de VAA de un segundo serotipo; y comprende una inserción de desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos en el bucle GH o bucle IV en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.

60 60 En algunas realizaciones, una proteína de cápside variante objeto comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 5; y una inserción de desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos en el bucle GH o bucle IV en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.

En algunas realizaciones, se aísla una proteína de la cápside variante objeto, por ejemplo, se purifica. En algunos casos, una proteína de la cápside variante objeto está incluida en un vector de VAA, que también se proporciona. Tal como se describe a continuación en detalle, una proteína de la cápside variante objeto puede estar incluida en un virión de VAA recombinante.

5

VIRIÓN DE VAA RECOMBINANTE

La presente descripción proporciona un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) que comprende: a) una proteína de la cápside de VAA variante, donde la proteína de la cápside de VAA variante comprende una inserción de desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos en un sitio de inserción en el bucle GH o bucle IV de la proteína de la cápside, en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, y donde la proteína de la cápside variante confiere infectividad incrementada de una célula retiniana en comparación con la infectividad de la célula retiniana por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental; y b) un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de un producto génico. En algunos casos, la célula retiniana es una célula fotorreceptora (por ejemplo, bastones y/o conos). En otros casos, la célula retiniana es una célula CGR. En otros casos, la célula retiniana es una célula de EPR. En otros casos, la célula retiniana es una célula de Müller. En otros casos, las células retinianas pueden incluir células amacrinas, células bipolares y células horizontales. Una "inserción de desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos" también se refiere en el presente documento a una "inserción peptídica" (por ejemplo, una inserción peptídica heteróloga). Una "correspondiente proteína de la cápside de VAA parental" se refiere a una proteína de la cápside de VAA del mismo serotipo de VAA, sin la inserción peptídica.

El sitio de inserción está en el bucle GH, o bucle IV, de la proteína de la cápside de VAA, por ejemplo, en una parte accesible por disolvente del bucle GH, o bucle IV, de la proteína de la cápside de VAA. Para el bucle GH, véase, por ejemplo, van Vliet y col. (2006) *Mol. Ther.* 14:809; Padron y col. (2005) *J. Virol.* 79:5.047; y Shen y col. (2007) *Mol. Ther.* 15:1.955. Por ejemplo, el sitio de inserción está dentro de los aminoácidos 570 a 611 de VAA2, dentro de los aminoácidos 571 a 612 de VAA1, dentro de los aminoácidos 560 a 601 de VAA5, dentro de los aminoácidos 571 a 612 de VAA6, dentro de los aminoácidos 572 a 613 de VAA7, dentro de los aminoácidos 573 a 614 de VAA8, dentro de los aminoácidos 571 a 612 de VAA9, o dentro de los aminoácidos 573 a 614 de VAA10

Desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos están insertados en un sitio de inserción en el bucle GH o bucle IV de la proteína de la cápside en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental. Por ejemplo, el sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 587 y 588 de VAA2, o las correspondientes posiciones de la subunidad de la cápside de otro serotipo de VAA. Se debería indicar que el sitio de inserción 587/588 se basa en una proteína de la cápside de VAA2. Desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos pueden estar insertados en un sitio correspondiente en un serotipo de VAA distinto del VAA2 (por ejemplo, VAA8, VAA9, etc.). Los expertos en la técnica sabrán, basándose en una comparación de las secuencias de aminoácidos de proteínas de la cápside de diversos serotipos de VAA, dónde un sitio de inserción "correspondiente a los aminoácidos 587 a 588 de VAA2" estará en una proteína de la cápside de cualquier serotipo de VAA dado. Las secuencias correspondientes a los aminoácidos 570 a 611 de proteína de la cápside VP1 de VAA2 (véase la Figura 5) en diversos serotipos de VAA se muestran en la Figura 6.

En algunas realizaciones, el sitio de inserción está en una sitio de inserción único entre dos aminoácidos adyacentes localizados entre los aminoácidos 570 y 614 de VP1 de cualquier serotipo de VAA, por ejemplo, el sitio de inserción está entre dos aminoácidos adyacentes localizados en los aminoácidos 570 a 614, aminoácidos 580 a 600, aminoácidos 570 a 575, aminoácidos 575 a 580 aminoácidos 580 a 585, aminoácidos 585 a 590, aminoácidos 590 a 600, o aminoácidos 600 a 610, de VP1 de cualquier serotipo o variante de VAA. Por ejemplo, el sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 580 y 581; aminoácidos 581 y 582, aminoácidos 583 y 584, aminoácidos 584 y 585, aminoácidos 585 y 586, aminoácidos 586 y 587, aminoácidos 587 y 588, aminoácidos 588 y 589, o aminoácidos 589 y 590. El sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 575 y 576, aminoácidos 576 y 577, aminoácidos 577 y 578, aminoácidos 578 y 579, o aminoácidos 579 y 580. El sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 590 y 591, aminoácidos 591 y 592, aminoácidos 592 y 593, aminoácidos 593 y 594, aminoácidos 594 y 595, aminoácidos 595 y 596, aminoácidos 596 y 597, aminoácidos 597 y 598, aminoácidos 598 y 599, o aminoácidos 599 y 600.

Por ejemplo, el sitio de inserción puede estar entre los aminoácidos 587 y 588 de VAA2, entre los aminoácidos 590 y 591 de VAA1 entre los aminoácidos 575 y 576 de VAA5, entre los aminoácidos 590 y 591 de VAA6, entre los aminoácidos 589 y 590 de VAA7, entre los aminoácidos 590 y 591 de VAA8, entre los aminoácidos 588 y 589 de VAA9, o entre los aminoácidos 589 y 590 de VAA10.

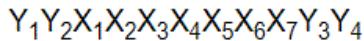
Péptidos de inserción

Como se indicó anteriormente, un virión de VAAr objeto comprende un péptido de desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos de longitud insertado en el bucle GH de la cápside de VAA. El péptido de inserción tiene una longitud de 5 aminoácidos, 6 aminoácidos, 7 aminoácidos, 8 aminoácidos, 9

aminoácidos, 10 aminoácidos o 11 aminoácidos.

El péptido de inserción puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las fórmulas expuestas a continuación.

5 Por ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el péptido de inserción es de Fórmula I:



10 donde:

cada uno de Y_1 - Y_4 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser, y Thr;
 X_1 , si está presente, se selecciona de Leu, Asn, y Lys;

15 X_2 se selecciona de Gly, Glu, Ala, y Asp;

X_3 se selecciona de Glu, Thr, Gly, y Pro;

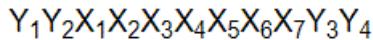
X_4 se selecciona de Thr, Ile, Gln, y Lys;

X_5 se selecciona de Thr y Ala;

X_6 se selecciona de Arg, Asn, y Thr;

20 X_7 , si está presente, se selecciona de Pro y Asn.

Como otro ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el péptido de inserción es de Fórmula IIa:



25 donde:

cada uno de Y_1 - Y_4 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser y Thr;

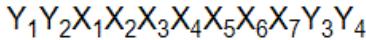
30 cada uno de X_1 - X_4 es cualquier aminoácido;

X_5 es Thr;

X_6 es Arg; y

X_7 es Pro.

35 Como otro ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el péptido de inserción es de Fórmula IIb:



40 donde:

cada uno de Y_1 - Y_4 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser y Thr;

X_1 , si está presente, se selecciona de Leu y Asn;

X_2 , si está presente, se selecciona de Gly y Glu;

45 X_3 se selecciona de Glu y Thr;

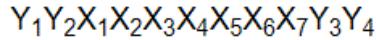
X_4 se selecciona de Thr y Ile;

X_5 es Thr;

X_6 es Arg; y

X_7 es Pro.

50 Como otro ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el péptido de inserción es de Fórmula III:



55 donde:

cada uno de Y_1 - Y_4 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser y Thr;

X_1 , si está presente, es Lys;

60 X_2 se selecciona de Ala y Asp;

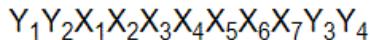
X_3 se selecciona de Gly y Pro;

X_4 se selecciona de Gln y Lys;

X_5 se selecciona de Thr y Ala;

X₆ se selecciona de Asn y Thr;
 X₇, si está presente, es Asn.

Como otro ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el péptido de inserción es de Fórmula IV:



donde:

10 cada uno de Y₁-Y₄, si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser y Thr;
 X₁, si está presente, es un aminoácido positivamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de Leu, Asn, Arg, Ala, Ser y Lys;
 15 X₂ es un aminoácido negativamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de Gly, Glu, Ala, Val, Thr y Asp;
 X₃ es un aminoácido negativamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de Glu, Thr, Gly, Asp o Pro;
 X₄ se selecciona de Thr, Ile, Gly, Lys, Asp y Gln;
 20 X₅ es un aminoácido polar, un alcohol (un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo libre), o un aminoácido hidrófobo; o se selecciona de Thr, Ser, Val y Ala;
 X₆ es un aminoácido positivamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de Arg, Val, Lys, Pro, Thr y Asn; y
 X₇, si está presente, es un aminoácido positivamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de 25 Pro, Gly, Phe, Asn y Arg.

25 Como ejemplos no limitantes, el péptido de inserción puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de LGETTRP (SEQ ID NO:13), NETITRP (SEQ ID NO:14), KAGQANN (SEQ ID NO:15), KDPKTTN (SEQ ID NO:16), KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59), y STGKVPN (SEQ ID NO:60).

30 En algunos casos, el péptido de inserción tiene desde 1 a 4 aminoácidos espaciadores (Y₁-Y₄) en el terminal amino y/o en el terminal carboxilo de una cualquiera de LGETTRP (SEQ ID NO:13), NETITRP (SEQ ID NO:14), KAGQANN (SEQ ID NO:15), KDPKTTN (SEQ ID NO:16), KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59), y STGKVPN (SEQ ID NO:60). Aminoácidos espaciadores adecuados incluyen, pero no se limitan 35 a, leucina, alanina, glicina y serina.

Por ejemplo, en algunos casos, un péptido de inserción tiene una de las siguientes secuencias de aminoácidos: LALGETTRPA (SEQ ID NO:45); LANETITRPA (SEQ ID NO:46), LAKAGQANNA (SEQ ID NO:47), LAKDPKTTNA (SEQ ID NO:48), LAKDTDTTRA (SEQ ID NO:61), LARAGGSVGA (SEQ ID NO:62), LVAADTTKFA (SEQ ID NO:63), y LASTGKVPNA (SEQ ID NO:64). Como otro ejemplo, en algunos casos, un péptido de inserción tiene una de las 40 siguientes secuencias de aminoácidos: AALGETTRPA (SEQ ID NO:49); AANETITRPA (SEQ ID NO:50), AAKAGQANNA (SEQ ID NO:51), y AAKDPKTTNA (SEQ ID NO:52). Como otro ejemplo más, en algunos casos, un péptido de inserción tiene una de las siguientes secuencias de aminoácidos: GLGETTRPA (SEQ ID NO:53); GNETITRPA (SEQ ID NO:54), GKAGQANNA (SEQ ID NO:55), y GKDPKTTNA (SEQ ID NO:56). Como otro ejemplo, 45 en algunos casos, un péptido de inserción comprende una de KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59), y STGKVPN (SEQ ID NO:60), flaqueadas en el terminal C por AA y en el terminal N por A; o comprende una de KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59), y STGKVPN (SEQ ID NO:60) flanqueada en el terminal C por G y en el terminal N por A.

50 En algunas realizaciones, una cápside de virión de VAAr objeto no incluye cualquier otra sustitución, inserción o delección de aminoácidos, aparte de una inserción de desde aproximadamente 7 aminoácidos a aproximadamente 10 aminoácidos en el bucle GH o bucle IV en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental. En otras realizaciones, una cápside de virión de VAAr objeto incluye inserciones, delecciones o sustituciones de 55 desde 1 a aproximadamente 25 aminoácidos, en comparación con la proteína de la cápside de VAA parental, además de una inserción de desde aproximadamente 7 aminoácidos a aproximadamente 10 aminoácidos en el bucle GH o bucle IV en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una cápside de virión de VAAr objeto incluye inserciones, delecciones o sustituciones de 60 desde 1 a aproximadamente 5, desde aproximadamente 5 a aproximadamente 10, desde aproximadamente 10 a aproximadamente 15, desde aproximadamente 15 a aproximadamente 20, o desde aproximadamente 20 a aproximadamente 25 aminoácidos, en comparación con la proteína de la cápside de VAA parental, además de una inserción de desde aproximadamente 7 aminoácidos a aproximadamente 10 aminoácidos en el bucle GH o bucle IV en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.

65 En algunas realizaciones, una cápside de virión de VAAr objeto no incluye una, dos, tres o cuatro, de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Y273F, Y444F, Y500F y Y730F.

En algunas realizaciones, un polipéptido de cápside variante objeto comprende, además de un péptido de inserción como se describió anteriormente, una, dos, tres o cuatro, de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Y273F, Y444F, Y500F y Y730F.

5 En algunas realizaciones, una cápside de virión de VAAr objeto es una cápside quimérica, por ejemplo, la cápside comprende una parte de una cápside de VAA de un primer serotipo de VAA y una parte de una cápside de VAA de un segundo serotipo; y comprende una inserción de desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos en el bucle GH o bucle IV en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.

10 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto comprende una proteína de la cápside que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos proporcionada en la Figura 5; y una inserción de desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos en el bucle GH o bucle IV en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.

15 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto comprende una proteína de la cápside que incluye un bucle GH que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos expuesta en la Figura 18A-C.

20 Un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula retiniana, en comparación con la infectividad de la célula retiniana por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.

25 En algunos casos, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula retiniana, cuando se administra por inyección intravítreo, en comparación con la infectividad de la célula retiniana por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, cuando se administra por inyección intravítreo.

30 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula fotorreceptora (bastón o cono), en comparación con la infectividad de la célula fotorreceptora por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.

35 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula fotorreceptora (bastón o cono), cuando se administra por inyección intravítreo, en comparación con la infectividad de la célula fotorreceptora por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, cuando se administra por inyección intravítreo.

40 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una CGR, en comparación con la infectividad de la CGR por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.

45 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una CGR, cuando se administra por inyección intravítreo, en comparación con la infectividad de la CGR por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, cuando se administra por inyección intravítreo.

50 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula de EPR, en comparación con la infectividad de la célula de EPR por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.

55 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula de EPR, cuando se administra por inyección intravítreo, en comparación con la infectividad de la célula de EPR por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.

60 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula de EPR, cuando se administra por inyección intravítreo, en comparación con la infectividad de la célula de EPR por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, cuando se administra por inyección intravítreo.

- En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula de Müller, en comparación con la infectividad de la célula de Müller por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.
- 5 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula de Müller, cuando se administra por inyección intravítreo, en comparación con la infectividad de la célula de Müller por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, cuando se administra por inyección intravítreo.
- 10 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula bipolar, en comparación con la infectividad de la célula bipolar por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.
- 15 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula bipolar, cuando se administra por inyección intravítreo, en comparación con la infectividad de la célula bipolar por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, cuando se administra por inyección intravítreo.
- 20 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula amacrina, en comparación con la infectividad de la célula amacrina por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.
- 25 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula amacrina, cuando se administra por inyección intravítreo, en comparación con la infectividad de la célula amacrina por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, cuando se administra por inyección intravítreo.
- 30 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula horizontal, en comparación con la infectividad de la célula horizontal por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, cuando se administra por inyección intravítreo.
- 35 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula horizontal, en comparación con la infectividad de la célula horizontal por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental.
- 40 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de una célula horizontal, cuando se administra por inyección intravítreo, en comparación con la infectividad de la célula horizontal por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, cuando se administra por inyección intravítreo.
- 45 En algunos casos, un virión de VAAr objeto presenta capacidad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, de atravesar la membrana limitante interna (MLI), en comparación con la capacidad de un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental de atravesar la MLI.
- 50 En algunos casos, un virión de VAAr objeto presenta capacidad incrementada al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 50 veces, o más de 50 veces, cuando se administra por inyección intravítreo, de atravesar la membrana limitante interna (MLI), en comparación con la capacidad de un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental de atravesar la MLI cuando se administra por inyección intravítreo.
- 55 Un virión de VAAr objeto puede cruzar la MLI, y también puede atravesar capas celulares, incluyendo células de Müller, células amacrinas, etc., para alcanzar las células fotorreceptoras y/o células de EPR. Por ejemplo, un virión de VAAr objeto, cuando se administra por inyección intravítreo, puede atravesar la MLI, y también puede atravesar capas celulares, incluyendo las células de Müller, células amacrinas, etc., para alcanzar las células fotorreceptoras o células de EPR.
- 60 En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto infecta selectivamente una célula retiniana, por ejemplo, un virión de VAAr objeto infecta una célula retiniana con 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces, o más de 50 veces más de especificidad que una célula no retiniana, por ejemplo, una célula fuera del ojo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto infecta selectivamente una célula retiniana, por ejemplo, un virión de VAAr infecta una célula fotorreceptora con 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces, o más de 50 veces

más de especificidad que una célula no retiniana, por ejemplo, una célula fuera del ojo.

En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto infecta selectivamente una célula fotorreceptora, por ejemplo, un virión de VAAr objeto infecta una célula fotorreceptora con 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces, o más de 50 veces más de especificidad que una célula no fotorreceptora presente en el ojo, por ejemplo, una célula ganglionar de la retina, una célula de Müller, etc.

En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto presenta infectividad incrementada al menos 10 veces, 15 veces, 20 veces, 25 veces, 50 veces, o más de 50 veces, de una célula fotorreceptora, cuando se administra por inyección intravítreo, en comparación con la infectividad de la célula fotorreceptora por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, cuando se administra por inyección intravítreo.

Productos génicos

Un virión de VAAr objeto comprende un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico. En algunas realizaciones, el producto génico es un ARN interferente. En algunas realizaciones, el producto génico es un aptámero. En algunas realizaciones, el producto génico es un polipéptido. En algunas realizaciones, el producto génico es una nucleasa específica a sitio que proporciona el silenciamiento (*knock-down*) específico a sitio de la función del gen.

ARN interferente

Cuando el producto génico es un ARN interferente (ARNi), el ARNi adecuado incluye ARNi que disminuye el nivel de un factor apoptótico o angiogénico en una célula. Por ejemplo, un ARNi puede ser un ARNhC o ARNhC que reduce el nivel de un producto génico que induce o fomenta la apoptosis en una célula. Los genes cuyos productos génicos inducen o fomentan la apoptosis se refieren, en el presente documento, como "genes pro-apoptóticos" y los productos de esos genes (ARNm; proteína) se refieren como "productos génicos pro-apoptóticos". Los productos génicos pro-apoptóticos incluyen, por ejemplo, productos del gen *Bax*, *Bid*, *Bak*, y *Bad*. Véase, por ejemplo, el documento de patente americana Nº 7.846.730.

Los ARN interferentes también podrían ser frente a un producto angiogénico, por ejemplo, VEGF (por ejemplo, Cands5; véase, por ejemplo, la publicación de Patente americana Nº 2011/0143400; Publicación de Patente americana Nº. 2008/0188437; y Reich y col. (2003) *Mol. Vis.* 9:210), VEGFR1 (por ejemplo, Sirna-027; véase, por ejemplo, Kaiser y col. (2010) *Am. J. Ophthalmol.* 150:33; y Shen y col. (2006) *Gene Ther.* 13:225), o VEGFR2 (Kou y col. (2005) *Biochem.* 44:15.064). Véase también, los documentos de Patente Americana Nº 6.649.596, 6.399.586, 5.661.135, 5.639.872, y 5.639.736; y los documentos de Patente americana Nº 7.947.659 y 7.919.473.

Aptámeros

Cuando el producto génico es un aptámero, aptámeros ilustrativos de interés incluyen un aptámero frente a factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Véase, por ejemplo, Ng y col. (2006) *Nat. Rev. Drug Discovery* 5:123; y Lee y col. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:18.902. Por ejemplo, un aptámero de VEGF puede comprender la secuencia de nucleótidos 5'-cgcaaucagugaaugcuuaucacauccg-3' (SEQ ID NO:17). También adecuado para su uso es un aptámero específico a PDGF, por ejemplo, E10030; véase, por ejemplo, Ni y Hui (2009) *Ophthalmologica* 223:401; y Akiyama y col. (2006) *J. Cell Physiol.* 207:407).

Polipéptidos

Cuando el producto génico es un polipéptido, el polipéptido generalmente es un polipéptido que aumenta la función de una célula retiniana, por ejemplo, la función de una célula fotorreceptora bastón o cono, una célula ganglionar de la retina, una célula de Müller, una célula bipolar, una célula amacrina, una célula horizontal o una célula del epitelio pigmentario de la retina. Polipéptidos ilustrativos incluyen polipéptidos neuroprotectores (por ejemplo, GDNF, CNTF, NT4, NGF, y NTN); polipéptidos anti-angiogénicos (por ejemplo, un receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) soluble; un anticuerpo de unión a VEGF; un fragmento del anticuerpo de unión a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo anti-VEGF de cadena sencilla); endostatina, tumstatina, angiostatina; un polipéptido Flt soluble (Lai y col. (2005) *Mol. Ther.* 12:659); una proteína de fusión Fc que comprende un polipéptido Flt soluble (véase, por ejemplo, Pechan y col. (2009) *Gene Ther.* 16:10); factor derivado de epitelio pigmentario (PEDF); un receptor Tie-2 soluble; etc.); tejido inhibidor de metaloproteinasa-3 (TIMP-3); una opsina sensible a la luz, por ejemplo, una rodopsina; polipéptidos anti-apoptóticos (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-X1); y similares. Polipéptidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF); factor 2 de crecimiento de fibroblastos; neururina (NTN); factor neurotrófico ciliar (CNTF); factor de crecimiento de nervio (NGF); neurotrotina-4 (NT4); factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF; por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos a una tramo contiguo de desde aproximadamente 200 aminoácidos a 247 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 11 (SEQ ID NO:11)); factor de crecimiento epidérmico; rodopsina; inhibidor

de apoptosis ligado a X; y gen erizo Sonic.

Opsinas sensibles a la luz adecuadas incluyen, por ejemplo, una opsina sensible a la luz como se describe en la Publicación de Patente americana Nº 2007/0261127 (por ejemplo, ChR2; Chop2); Publicación de Patente americana Nº 2001/0086421; Publicación de Patente americana Nº 2010/0015095; y Diester y col. (2011) *Nat. Neurosci.* 14:387.

5 Polipéptidos adecuados también incluyen retinosquisina (por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos 10 aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con un tramo contiguo de desde aproximadamente 200 aminoácidos a 224 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 10 (SEQ ID NO:10). Polipéptidos adecuados incluyen, por ejemplo, proteína 1 que interactúa con el regulador de GTPasa de retinitis pigmentosa (RGPR) (véase, por ejemplo, los Nº de acceso de GenBank Q96KN7, Q9EPQ2, y Q9GLM3) (por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos 15 aproximadamente 95 %, al menos 20 aproximadamente 98 %, al menos 25 aproximadamente 99 %, o 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con un tramo contiguo de desde aproximadamente 1.150 aminoácidos a aproximadamente 1.200 aminoácidos, o desde aproximadamente 1.200 aminoácidos a 1.286 aminoácidos, de la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 16 (SEQ ID NO:21); periferina-2 (Prph2) (véase, por ejemplo, Nº de acceso de GenBank NP_000313 (por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 30 aproximadamente 90 %, al menos 35 aproximadamente 95 %, al menos 40 aproximadamente 98 %, al menos 45 aproximadamente 99 %, o 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos con un tramo contiguo de desde aproximadamente 300 aminoácidos a 346 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 14 (SEQ ID NO:19); y Travis y col. (1991) *Genomics* 10:733); periferina (por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 45 aproximadamente 90 %, al menos 50 aproximadamente 95 %, al menos 55 aproximadamente 98 %, al menos 60 65 aproximadamente 99 %, o 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos a un tramo contiguo de desde aproximadamente 400 aminoácidos a aproximadamente 470 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 15 (SEQ ID NO:20); una proteína específica a epitelio pigmentario de la retina (EPR65), (por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 75 80 85 90 %, al menos 95 %, al menos 100 %, de identidad de secuencia de aminoácidos a un tramo contiguo de desde aproximadamente 200 aminoácidos a 247 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 12 (SEQ ID NO:12)) (véase, por ejemplo, GenBank AAC39660; y Morimura y col. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:3.088); y similares.

35 Polipéptidos adecuados también incluyen: CHM (coroideremia (proteína 1 acompañante Rab)), un polipéptido que, cuando es defectuoso o está perdido, causa coroideremia (véase, por ejemplo, Donnelly y col. (1994) *Hum. Mol. Genet.* 3:1.017; y van Bokhoven y col. (1994) *Hum. Mol. Genet.* 3:1.041); y homólogo de Crumbs 1 (CRB1), un polipéptido que, cuando es defectuoso o está perdido, causa amaurosis congénita de Leber y retinitis pigmentosa (véase, por ejemplo, den Hollander y col. (1999) *Nat. Genet.* 23:217; y Nº de Acceso de GenBank CAM23328).

40 45 Polipéptidos adecuados también incluyen polipéptidos que, cuando son defectuosos o están perdidos, conducen a acromatopsia, donde tales polipéptidos incluyen, por ejemplo, subunidad alfa del canal regulado de GMPc del cono fotorreceptor (CNGA3) (véase, por ejemplo, Nº de acceso de GenBank NP_001289; y Booij y col. (2011) *Ophthalmology* 118:160-167); subunidad beta del canal catiónico regulado de GMPc del cono fotorreceptor (CNGB3) (véase, por ejemplo, Kohl y col. (2005) *Eur. J. Hum. Genet.* 13(3):302); proteína de unión a nucleótido de guanina (G proteína), polipéptido 2 de actividad de transducción alfa (GNAT2) (ACHM4); y ACHM5; y polipéptidos que, cuando son defectuosos o deficientes, conducen a diversas formas de daltonismo (por ejemplo, L-opsina, M-opsina y S-opsina). Véase, Mancuso y col. (2009) *Nature* 461(7.265):784-787.

50 **Endonucleasas específicas a sitio**

55 En algunos casos, un producto génico de interés es una endonucleasa específica a sitio que proporciona silenciamiento específico a sitio de la función del gen, por ejemplo, cuando la endonucleasa desactiva un alelo asociado con una enfermedad de la retina. Por ejemplo, cuando un alelo dominante codifica una copia defectuosa de un gen que, cuando es de tipo natural, es una proteína estructural de la retina y/o proporciona función de la retina normal, una endonucleasa específica a sitio se puede dirigir al alelo defectuoso y desactivar el alelo defectuoso.

60 65 Además de la desactivación de un alelo defectuoso, también se puede usar una endonucleasa específica a sitio para estimular la recombinación homóloga con un ADN donante que codifica una copia funcional de la proteína codificada por el alelo defectuoso. Por tanto, por ejemplo, un virión de VAAr objeto tanto se puede usar para administrar una endonucleasa específica a sitio que desactiva un alelo defectuoso, como se puede usar para administrar una copia funcional del alelo defectuoso, dando como resultado la reparación del alelo defectuoso, proporcionando de ese modo la producción de una proteína retiniana funcional (por ejemplo, retinosquisina funcional, EPR65 funcional, periferina funcional, etc.). Véase, por ejemplo, Li y col. (2011) *Nature* 475:217. En algunas realizaciones, un virión de VAAr objeto comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una endonucleasa específica a sitio; y una secuencia de nucleótidos heteróloga que codifica una copia funcional de un alelo defectuoso, donde la copia

funcional codifica una proteína retiniana funcional. Las proteínas retinianas funcionales incluyen, por ejemplo, retinosquisina, EPR65, proteína 1 que interactúa con el regulador de GTPasa de retinitis pigmentosa (RGPR), periferina, periferina-2 y similares.

- 5 Endonucleasas específicas a sitios que son adecuadas para su uso incluyen, por ejemplo, nucleasas de dedo de zinc (ZFN); y nucleasas efectoras similares a activador de transcripción (TALEN), donde tales endonucleasas específicas a sitio no son de origen natural y están modificadas para dirigir un gen específico. Tales nucleasas específicas a sitios se pueden modificar por ingeniería para cortar localizaciones específicas dentro de un genoma, y, a continuación, uniéndose a extremo no homólogo puede reparar la rotura mientras inserta o deleciona diversos 10 nucleótidos. Tales endonucleasas específicas a sitio (también referidas como "INDEL") a continuación echan la proteína fuera del marco e desactivan eficazmente el gen. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente americana Nº 2011/0301073.

Secuencias reguladoras

- 15 En algunas realizaciones, una secuencia de nucleótidos codificante de un producto genético de interés está operativamente ligada a un promotor constitutivo. En otras realizaciones, una secuencia de nucleótidos codificante de un producto génico de interés está operativamente ligada a un promotor inducible. En algunos ejemplos, una secuencia de nucleótidos codificante de un producto génico de interés está operativamente ligada a un elemento 20 regulador específico a tejido o específico a tipo celular. Por ejemplo, en algunos ejemplos, una secuencia de nucleótidos codificante de un producto génico de interés está operativamente ligada a un elemento regulador específico a fotorreceptor (por ejemplo, un promotor específico a fotorreceptor), por ejemplo, un elemento regulador que confiere expresión selectiva del gen operativamente ligado en una célula fotorreceptora. Los elementos reguladores específicos a fotorreceptor adecuados incluyen, por ejemplo, un promotor de rodopsina, un promotor de 25 rodopsina quinasa (Young y col. (2003) *Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:4.076); un promotor del gen de beta fosfodiesterasa (Nicoud y col. (2007) *J. Gene Med.* 9:1.015); un promotor del gen de retinitis pigmentosa (Nicoud y col. (2007) *supra*); un potenciador del gen de la proteína interfotorreceptora de unión a retinoide (IRBP) (Nicoud y col. (2007) *supra*); un promotor del gen de IRBP (Yokoyama y col. (1992) *Exp. Eye Res.* 55:225).

30 COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

- La presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende: a) un virión de VAAr objeto, como se describió anteriormente; y b) un vehículo, diluyente, excipiente o tampón farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el vehículo, diluyente, excipiente o tampón farmacéuticamente aceptable es adecuado para 35 su uso en un ser humano.

Tales excipientes, vehículos, diluyentes y tampones incluyen cualquier agente farmacéutico que se pueda administrar sin toxicidad indebida. Excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Sales farmacéuticamente aceptables pueden incluir en las 40 mismas, por ejemplo, sales de ácido mineral tales como clorhidratos, bromohidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de los ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Además, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes y emulsionantes, sustancias de tamponamiento de pH y similares pueden estar presentes en tales vehículos. En la técnica se conocen una amplia diversidad de excipientes 45 farmacéuticamente aceptables y no necesitan ser tratados en detalle en el presente documento. Excipientes farmacéuticamente aceptables han sido ampliamente descritos en diversas publicaciones, incluyendo, por ejemplo, A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20^a edición, Lippincott, Williams, & Wilkins; "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems" (1999) H.C. Ansel y col., eds., 7^a ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; y "Handbook of Pharmaceutical Excipients" (2000) A.H. Kibbe y col., eds., 3^a ed. Amer. 50 Pharmaceutical Assoc.

55 MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN DE UN PRODUCTO GÉNICO A UNA CÉLULA RETINIANA Y TRATAMIENTO

MÉTODOS

- La presente descripción proporciona un método de administración de un producto génico a una célula retiniana en un individuo, comprendiendo el método la administración al individuo de un virión de VAAr objeto como se describió anteriormente. El producto génico puede ser un polipéptido o un ARN interferente (por ejemplo, un ARNh, un ARNc y similares), un aptámero, o una endonucleasa específica a sitio como se describió anteriormente. La administración de un producto génico a una célula retiniana puede proporcionar tratamiento de una enfermedad de la retina. La 60 célula retiniana puede ser un fotorreceptor, una célula ganglionar de la retina, una célula de Müller, una célula bipolar, una célula amacrina, una célula horizontal o una célula de epitelio pigmentario de la retina. En algunos casos, la célula retiniana es una célula fotorreceptora, por ejemplo, una célula bastón o cono.

La presente descripción proporciona un método de tratamiento de una enfermedad de la retina, comprendiendo el método la administración a un individuo que lo necesite de una cantidad eficaz de un virión de VAAr objeto como se describió anteriormente. Un virión de VAAr objeto se puede administrar por inyección intraocular, por inyección

intravítreo, o por cualquier otro modo conveniente o vía de administración. Otros modos convenientes o vías de administración incluyen, por ejemplo, intravenoso, intranasal, etc.

5 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" caerá en un intervalo relativamente amplio que se puede determinar a través de la experimentación y/o los ensayos clínicos. Por ejemplo, por inyección *in vivo*, es decir, inyección directamente en el ojo, una dosis terapéuticamente eficaz estará en el orden de desde aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{15} de los viriones de VAAr, por ejemplo, desde aproximadamente 10^8 a 10^{12} viriones de VAAr. Para la transducción *in vitro*, una cantidad eficaz de viriones de VAAr a administrar a células estará en el orden de desde aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{13} de los viriones de VAAr. Otras dosis eficaces fácilmente pueden ser establecidas por un experto en la técnica a través de pruebas rutinarias que establecen curvas de respuesta de dosis.

10

15 En algunas realizaciones, más de una administración (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más administraciones) se pueden emplear para alcanzar el nivel deseado de la expresión génica durante un periodo de diversos intervalos, por ejemplo, diario, semanal, mensual, anual, etc.

20 Enfermedades oculares que se pueden tratar usando un método objeto incluyen, pero no se limitan a, neuroretinopatía macular aguda; enfermedad de Behcet; neovascularización coroidea, uveitis diabética; histoplasmosis; degeneración macular, tal como degeneración macular aguda, degeneración macular relacionada con la edad no exudativa y degeneración macular relacionada con la edad exudativa; edema, tal como edema macular, edema macular cistoide y edema macular diabético; coroiditis multifocal; trauma ocular que afecta a un sitio o localización ocular posterior; tumores oculares; trastornos de la retina, tales como oclusión de la vena central de la retina, retinopatía diabética (incluyendo retinopatía diabética proliferativa), vitreoretinopatía proliferativa (VRP), enfermedad oclusiva de la arteria de la retina, desprendimiento de retina, enfermedad de retina uveítico; oftalmia simpatética; síndrome de Vogt Koyanagi-Harada (VKH); difusión de la úvea; una afección ocular posterior causada por o influida por un tratamiento con láser ocular; afecciones oculares posteriores causadas por o influidas por una terapia fotodinámica; fotocoagulación, retinopatía por radiación; trastornos de la membrana epirretiniana; oclusión de la vena ramificada de la retina; neuropatía óptica isquémica anterior; disfunción diabética de la retina no retinopatía; retinosquisis; retinitis pigmentosa; glaucoma; síndrome de Usher; distrofia cono-bastón; enfermedad de Stargardt (fundus flavimaculatus); degeneración macular hereditaria; degeneración coriorretiniana; amaurosis congénita de Leber; ceguera nocturna estacionaria congénita; coroideremia; síndrome de Bardet-Biedl; telangiectasia macular; neuropatía óptica hereditaria de Leber; retinopatía de prematuridad; y trastornos de visión de color; incluyendo acromatopsia, protanopia, deuteranopia y tritanopia.

25

30

35

ÁCIDOS NUCLEICOS Y CÉLULAS HOSPEDADORAS

40 La presente descripción proporciona un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variante objeto como se describió anteriormente, donde la proteína de la cápside de VAA variante comprende una inserción de desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos en el bucle GH o bucle IV en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, y donde la proteína de la cápside variante, cuando está presente en un virión de VAA, proporciona infectividad incrementada de una célula retiniana en comparación con la infectividad de la célula retiniana por un virión de VAA que comprende la correspondiente proteína de la cápside de VAA parental. Un ácido nucleico aislado objeto puede ser un vector de VAA, por ejemplo, un vector de VAA recombinante.

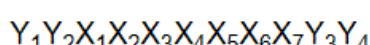
45

Péptidos de inserción

50 Una proteína de la cápside de VAA variante codificada por un ácido nucleico objeto tiene un péptido de inserción de desde aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos de longitud insertado en el bucle GH de una cápside de VAA. El péptido de inserción tiene una longitud de 5 aminoácidos, 6 aminoácidos, 7 aminoácidos, 8 aminoácidos, 9 aminoácidos, 10 aminoácidos o 11 aminoácidos.

55 El péptido de inserción puede comprender una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las fórmulas expuestas a continuación.

Por ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el péptido de inserción es de Fórmula I:



60 donde:

65 cada uno de Y_1 - Y_4 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser, y Thr;
 X_1 , si está presente, se selecciona de Leu, Asn, y Lys;
 X_2 se selecciona de Gly, Glu, Ala, y Asp;

- 5 X_3 se selecciona de Glu, Thr, Gly, y Pro;
 X_4 se selecciona de Thr, Ile, Gln, y Lys;
 X_5 se selecciona de Thr y Ala;
 X_6 se selecciona de Arg, Asn, y Thr;
 X_7 , si está presente, se selecciona de Pro y Asn.

Como otro ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el péptido de inserción es de Fórmula IIa:

10 $Y_1 Y_2 X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 Y_3 Y_4$

donde:

- 15 cada uno de Y_1 - Y_4 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser y Thr;
 cada uno de X_1 - X_4 es cualquier aminoácido;
 X_5 es Thr;
 X_6 es Arg; y
 X_7 es Pro.

- 20 Como otro ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el péptido de inserción es de Fórmula IIb:

25 $Y_1 Y_2 X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 Y_3 Y_4$

donde:

- 30 cada uno de Y_1 - Y_4 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser y Thr;
 X_1 , si está presente, se selecciona de Leu y Asn;
 X_2 , si está presente, se selecciona de Gly y Glu;
 X_3 se selecciona de Glu y Thr;
 X_4 se selecciona de Thr y Ile;
 X_5 es Thr;
 X_6 es Arg; y
 X_7 es Pro.

- 35 Como otro ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el péptido de inserción es de Fórmula III:

40 $Y_1 Y_2 X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 Y_3 Y_4$

donde:

- 45 cada uno de Y_1 - Y_4 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser y Thr;
 X_1 , si está presente, es Lys;
 X_2 se selecciona de Ala y Asp;
 X_3 se selecciona de Gly y Pro;
 X_4 se selecciona de Gln y Lys;
 X_5 se selecciona de Thr y Ala;
 X_6 se selecciona de Asn y Thr;
 X_7 , si está presente, es Asn.

Como otro ejemplo, un péptido de inserción puede ser un péptido de desde 5 a 11 aminoácidos de longitud, donde el péptido de inserción es de Fórmula IV:

55 $Y_1 Y_2 X_1 X_2 X_3 X_4 X_5 X_6 X_7 Y_3 Y_4$

donde:

- 60 cada uno de Y_1 - Y_4 , si está presente, se selecciona independientemente de Ala, Leu, Gly, Ser y Thr;
 X_1 , si está presente, es un aminoácido positivamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de Leu, Asn, Arg, Ala, Ser y Lys;
 X_2 es un aminoácido negativamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de Gly, Glu, Ala, Val, Thr y Asp;

X₃ es un aminoácido negativamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de Glu, Thr, Gly, Asp o Pro;

X₄ se selecciona de Thr, Ile, Gly, Lys, Asp y Gln;

5 X₅ es un aminoácido polar, un alcohol (un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo libre), o un aminoácido hidrófobo; o se selecciona de Thr, Ser, Val y Ala;

X₆ es un aminoácido positivamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de Arg, Val, Lys, Pro, Thr y Asn; y

10 X₇, si está presente, es un aminoácido positivamente cargado o un aminoácido no cargado; o se selecciona de Pro, Gly, Phe, Asn y Arg.

15 Como ejemplos no limitantes, el péptido de inserción puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de LGETTRP (SEQ ID NO:13), NETITRP (SEQ ID NO:14), KAGQANN (SEQ ID NO:15), KDPKTTN (SEQ ID NO:16), KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59), y STGKVPN (SEQ ID NO:60).

20 15 En algunos casos, el péptido de inserción tiene desde 1 a 4 aminoácidos espaciadores (Y₁-Y₄) en el terminal amino y/o en el terminal carboxilo de una cualquiera de LGETTRP (SEQ ID NO:13), NETITRP (SEQ ID NO:14), KAGQANN (SEQ ID NO:15), KDPKTTN (SEQ ID NO:16), KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59), y STGKVPN (SEQ ID NO:60). Aminoácidos espaciadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, leucina, alanina, glicina y serina.

25 Por ejemplo, en algunos casos, un péptido de inserción tiene una de las siguientes secuencias de aminoácidos: LALGETTRPA (SEQ ID NO:45); LANETITRPA (SEQ ID NO:46), LAKAGQANNA (SEQ ID NO:47), LAKDPKTTNA (SEQ ID NO:48), LAKDTDTTRA (SEQ ID NO:61), LARAGGSVGA (SEQ ID NO:62), LVAADTTKFA (SEQ ID NO:63), y LASTGKVPNA (SEQ ID NO:64). Como otro ejemplo, en algunos casos, un péptido de inserción tiene una de las siguientes secuencias de aminoácidos: AALGETTRPA (SEQ ID NO:49); AANETITRPA (SEQ ID NO:50), AAKAGQANNA (SEQ ID NO:51), y AAKDPKTTNA (SEQ ID NO:52). Como otro ejemplo más, en algunos casos, un péptido de inserción tiene una de las siguientes secuencias de aminoácidos: GLGETTRPA (SEQ ID NO:53); GNETITRPA (SEQ ID NO:54), GKAGQANNA (SEQ ID NO:55), y GKDPKTTNA (SEQ ID NO:56). Como otro ejemplo, 30 en algunos casos, un péptido de inserción comprende una de KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59), y STGKVPN (SEQ ID NO:60), flanqueada en el terminal C por AA y en el terminal N por A; o comprende una de KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59), y STGKVPN (SEQ ID NO:60) flanqueada en el terminal C por G y en el terminal N por A.

35 35 Un vector de VAA recombinante objeto se puede usar para generar un virión de VAA recombinante objeto, como se describió anteriormente. Por tanto, la presente descripción proporciona un vector de VAA recombinante que, cuando se introduce en una célula adecuada, puede proporcionar la producción de un virión de VAA recombinante objeto.

40 La presente invención proporciona además células hospedadoras, por ejemplo, células hospedadoras aisladas (genéticamente modificadas), que comprenden un ácido nucleico objeto. Una célula hospedadora objeto puede ser una célula aislada, por ejemplo, una célula en cultivo *in vitro*. Una célula hospedadora objeto es útil para producir un virión de VAAr objeto, como se describe más adelante. Cuando una célula hospedadora objeto se usa para producir un virión de VAAr objeto, se refiere como "célula empaquetadora". En algunas realizaciones, una célula hospedadora objeto está genéticamente modificada de manera estable con un ácido nucleico objeto. En otras 45 realizaciones, una célula hospedadora objeto están genéticamente modificada de manera transitoria con un ácido nucleico objeto.

50 Un ácido nucleico objeto se introduce de manera estable o transitoria en una célula hospedadora, usando técnicas establecidas, que incluyen, pero no se limitan a, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección mediada por liposoma y similares. Para transformación estable, un ácido nucleico objeto generalmente incluirá además un marcador seleccionable, por ejemplo, cualquiera de los diversos marcadores seleccionables bien conocidos tales como resistencia a neomicina, y similares.

55 Una célula hospedadora se genera introduciendo un ácido nucleico objeto dentro de alguna de diversas células, por ejemplo, células mamíferas, incluyendo, por ejemplo, células murinas y células primates (por ejemplo, células humanas). Células mamíferas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células primarias y líneas celulares, donde las líneas celulares adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células 293, células COS, células HeLa, células Vero, fibroblastos de ratón 3T3, fibroblastos C3H10T1/2, células CHO y similares. Ejemplos no limitantes de células hospedadoras adecuadas incluyen, por ejemplo, células HeLa (por ejemplo, "American Type Culture Collection" (ATCC) Nº CCL-2), células CHO (por ejemplo, ATCC Nº CRL9618, CCL61, CRL9096), células 293 (por ejemplo, ATCC Nº CRL-1573), células Vero, células NIH 3T3 (por ejemplo, ATCC Nº CRL-1658), células Huh-7, células BHK (por ejemplo, ATCC Nº CCL10), células PC12 (ATCC No. CRL1721), células COS, células COS-7 (ATCC Nº CRL1651), células RAT1, células L de ratón (ATCC Nº CCL1.3), células de riñón embrionario humano (HEK) (ATCC Nº CRL1573), células HLHepG2, y similares. Una célula hospedadora objeto también se puede producir usando un baculovirus para infectar células de insecto tales como células Sf9, que producen VAA (véase, por ejemplo, el documento de Patente Nº 7.271.002; Publicación de Patente americana 12/297.958).

En algunas realizaciones, una célula hospedadora genéticamente modificada objeto incluye, además de un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína de la cápside de VAA variante, como se describió anteriormente, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos codificante de una o más proteínas rep de VAA. En otras realizaciones, una célula hospedadora objeto comprende además un vector

5 de VAAr. Un virión de VAAr se puede generar usando una célula hospedadora objeto. Métodos de generación de un virión de VAAr están descritos en, por ejemplo, la Publicación de Patente americana Nº 2005/0053922 y Publicación de Patente americana 2009/0202490.

Ejemplos

10 Los siguientes ejemplos se proponen para proporcionar a los expertos en la técnica una descripción completa y una descripción de cómo producir y usar la presente invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención ni pretenden representar que los experimentos de más adelante son todos o los únicos experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.) pero algunos errores experimentales y desviaciones se deberían tener en cuenta. A menos que se indique lo contrario, partes son partes en peso, peso molecular es el peso molecular promedio, temperatura es en grados Celsius, y la presión está en o cerca de la atmosférica. Se pueden usar abreviaciones estándar, por ejemplo, pb, par(es) de bases; kb, kilobase(s), pl, picolitro(s); s o seg, segundo(s), min, minuto(s); h o hr, hora(s); aa, aminoácido(s); kb, kilobase(s); pb, par(es) de bases; nt, nucleótido(s); i.m., intramuscular(mente); i.p., intraperitoneal(mente); s.c., subcutánea(mente); y similares.

Ejemplo 1: variante de VAA con transducción aumentada de células retinianas

25 El planteamiento usado era crear una genoteca de demostración de péptido introduciendo un sitio AvrII único en el genoma de VAA2 de tipo natural entre los aminoácidos 587 y 588 por mutagénesis por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Un inserto de 21 nucleótido aleatorio, 7mer For, se usó para sintetizar los insertos de ADNdc, junto con el cebador antisentido 7mer Rev. Los insertos resultantes de ADNdc se clonaron en el sitio AvrII del genoma después de la digestión con *Nhe*I, produciendo una genoteca de demostración de 7mer diversa que, a continuación, se empaquetó (Perabo y col., 2003; Müller y col., 2003). El virus se generó de modo que cada genoma

30 viral se empaquetó o se sometió a encapsidación dentro de la proteína de la cápside variante que ese genoma codificaba. A este respecto, las mejoras funcionales identificadas a través de la selección pueden estar ligadas a la secuencia de genoma codificante de esta función mejorada contenida dentro de la cápside del virus.

35 Esta genoteca se sometió a selección positiva dentro de ratones rho-GFP (Wensel y col. (2005) *Vision Res.* 45:3.445). Brevemente, en una ronda de selección, se inyectaron inyectoramente ratones rho-GFP adultos con 2 μ l de genoteca purificada por iodixanol, dializada con solución salina tamponada con fosfato (PBS) con una titulación genómica de aproximadamente 1×10^{12} genomas virales (gv)/ml. Se pasó una aguja desechable 30 1/2 gauge ultrafina a través de la esclerótica del ojo del animal, en el ecuador y próximo a los limbos, dentro de la cavidad vítrea. La inyección de 2 μ l de virus se realizó con observación directa de la aguja en el centro de la cavidad vítrea.

40 Una semana después de la inyección, los ojos se sometieron a enucleación y las retinas se disociaron usando un tratamiento con luz, papaina proteasa, seguido por aislamiento por clasificador de célula activada por fluorescencia (FACS) de poblaciones fotorreceptoras. A continuación, los viriones favorables se amplificaron por PCR a partir de extracciones genómicas posteriores y se clonaron más y se reempaquetaron para inyección.

45 Iteraciones adicionales de esta selección se realizaron, reduciendo el conjunto de variantes a un subconjunto con las mutaciones más permisivas. Después de tres iteraciones, se realizó una ronda de PCR propensa a error para crear una generación adicional de variantes para la selección. En total, este proceso se repitió para dos generaciones. A este respecto, este proceso de evolución dirigida creó variantes de VAA permisivas a fotorreceptor por la aplicación de selección positiva y mutagénesis inducida, similar al proceso de la evolución natural.

50 Posteriormente, los genes *cap* de cincuenta variantes se secuenciaron para determinar las variantes más prominentes y eficaces para tener mutaciones permisivas para la transducción intravítrea de fotorreceptor. De los 50 clones, 46 dieron secuencias legibles de un inserto 7mer. Notablemente, casi dos tercios de los clones contenían el mismo motivo de 7mer distinto (\sim^{588} LGETTRP~; SEQ ID NO:13). Interesantemente, la próxima variante más prominente (\sim^{588} NETITRP~; SEQ ID NO:14) también contenía un motivo flanqueador similar que consistía en un resto de arginina positivamente cargado en entre una treonina polar y un resto de prolina no polar (TRP).

Tabla 1

Clon	Frecuencia aproximada (%)	Frecuencia
\sim^{588} LGETTRP~ (SEQ ID NO:13)	64	31
\sim^{588} NETITRP~ (SEQ ID NO:14)	12	5
\sim^{588} KAGQANN~ (SEQ ID NO:15)	6	3
\sim^{588} KDPKTTN~ (SEQ ID NO:16)	4	2
\sim^{588} KDTDTTR~ (SEQ ID NO:57)		2

~ ⁵⁸⁸ RAGGSVG (SEQ ID NO:58)		1
~ ⁵⁸⁸ AVDTTKF (SEQ ID NO:59)		1
~ ⁵⁸⁸ STGKVPN (SEQ ID NO:60)		1

Tabla 1. La secuenciación de variantes aisladas a partir de evolución dirigida revela un alto grado de convergencia en las genotecas virales. Todas las variantes derivadas de la genoteca 7mer de VAA2, con aproximadamente 64 % de variantes que contienen el mismo motivo 7mer (~588LGETTRP~ (SEQ ID NO:13).

5 Entre las secuencias del inserto 7mer, había preferencias moderadas en posiciones particulares, por ejemplo, un aminoácido positivamente cargado en la posición 1; un aminoácido negativamente cargado en la posición 2; un alcohol (por ejemplo, un aminoácido que tiene un grupo alcohol (un grupo hidroxilo libre), tal como Thr o Ser) en la posición 5.

10 Los insertos 7mer estaban flanqueados por espaciadores, como se muestran en la Tabla 2:

Clon	Frecuencia
~ ⁵⁸⁸ LALGETTRPA~ (SEQ ID NO:45)	31
~ ⁵⁸⁸ LANETITRPA~ (SEQ ID NO:46)	5
~ ⁵⁸⁸ LAKAGQANNA~ (SEQ ID NO:47)	3
~ ⁵⁸⁸ LAKDPKTTNA~ (SEQ ID NO:48)	2
~ ⁵⁸⁸ LAKDTDTTRA~ (SEQ ID NO:61)	2
~ ⁵⁸⁸ LARAGGSVGA~ (SEQ ID NO:62)	1
~ ⁵⁸⁸ LVAADTTKFA~ (SEQ ID NO:63)	1
~ ⁵⁸⁸ LASTGKVPNA~ (SEQ ID NO:64)	1

15 Figura 1. Modelo proteína de la cápside tridimensional representativo de VAA2 que contiene un heptámero aleatorio (mostrado en naranja) después del aminoácido 587. Esta área de la cápside de VAA2 probablemente participa en la unión a receptor de superficie celular.

20 Teniendo en cuenta el alto grado de convergencia de genoteca a partir de la selección anteriormente descrita, una forma recombinante de ~⁵⁸⁸LGETTRP~ de VAA2 (SEQ ID NO:13; nombrada 7M8) se clonó y empaquetó el vector con un transgen scCAG-GFP para visualizar su perfil de transducción. Tres semanas después de la inyección intravítreo en ratones adultos, se observó expresión fuerte en numerosos tipos celulares, incluyendo células ganglionares de la retina (CGR) y células de Müller. Importantemente, se observó transducción de fotorreceptores en retinas inyectadas con 7M8, visto por la expresión de GFP en núcleos de la capa nuclear externa (CNE) (flechas rojas) y en segmentos externos (Figura 2, flecha azul), mientras que VAA2 no mostró expresión discernible de fotorreceptor.

25 Figura 2. La variante 7M8 de VAA2 (derecha) demuestra mayores niveles de transducción de fotorreceptor intravítreo en relación con VAA2 (izquierda). El microscopio confocal de secciones de retina transversales tres semanas después de la inyección intravítreo de 2 μ l de 1×10^{12} gv/ml de 7M8 de VAA2 y scCAG GFP de VAA2 en ratones adultos. Las flechas rojas (arriba) indican el núcleo fotorreceptor y la flecha azul (arriba) indica segmentos exteriores de fotorreceptor.

30 Teniendo en cuenta estas ganancias en la transducción de la célula de la retina, se hizo un intento de incrementar la especificidad en la expresión a través del uso de un transgen ssRho-eGFP que contenía un promotor de rodopsina específico a fotorreceptor para resolver mejor las eficacias de transducción específicamente en fotorreceptores (Figura 3). De hecho, el uso de un promotor Rho específico a fotorreceptor limitó la expresión de GFP a los fotorreceptores. Se hizo un intento de mejorar la eficacia de transducción de 7M8 combinando un planteamiento de diseño racional con el planteamiento anterior de evolución dirigida. Por lo tanto, cuatro restos de tirosina expuestos de superficie se mutaron a fenilalaninas en la cápside de 7M8 (Y273F, Y444F, Y500F y Y730F) que previamente se ha mostrado que incrementan la infectividad del fotorreceptor (Petr-Silva y col., 2009). Interesantemente, la adición de mutaciones disminuyó el número de fotorreceptores sometidos a transducción en comparación con el virus original mostrado por clasificación FAC de los fotorreceptores GFP(+) de retinas infectadas con 7m8 o 7m8-4YF (Figura 4).

35 Figura 3. Imágenes de fluorescencia representativas de criocortes de retina que muestran expresión de GFP resultante de 7m8 que lleva el gen de GFP bajo el control del promotor CAG ubicuo (izquierda) o un promotor de Rho específico a fotorreceptor (derecha).

40 Figura 4. Las células fotorreceptoras GFP(+) por millón de células de retina contadas por citometría de flujo. 7m8 transduce más de dos veces la cantidad de fotorreceptores en comparación con 7m8 que lleva 4 mutaciones de tirosina (arriba).

Ejemplo 2: Tratamiento de retinosquisis

Usando la construcción de expresión 7m8-rho-RS1, se administró una proteína retinosquisina funcional (RS1) a ratones deficientes en retinosquisina (ratones deficientes en Rslh; Rslh es el homólogo de ratón de la RS1 humana).

- 5 El vector comprende una secuencia de nucleótidos codificante de una proteína retinosquisina funcional bajo control transcripcional de un promotor de rodopsina. Véase las Figuras 13A-C, donde la secuencia de nucleótidos en negrita y subrayada (nucleótidos 4.013-4.851) son el promotor de rodopsina; y los nucleótidos 4.866-5.540 (con las secuencias de inicio atg y de parada tga mostradas en negrita) codifican una proteína RS1 humana.
- 10 La construcción 7m8-rho-RS1 se administró de manera intravítreo a ratones Rslh-/- en P15. Los ratones Rslh-/- se generaron a través de alteración dirigida de exón 3 del gen Rslh, como se describe (Weber y col. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:6222). Los ratones Rslh-/- son deficientes en el producto proteico Rslh, tienen un ERG electronegativo (por ejemplo, una onda b reducida con conservación relativa de la onda a) y división de las capas de la retina, similar a lo visto en pacientes de retinosquisis humana. La inyección del vector 7m8-rho-RS1 en los Rslh-/- 15 conduce a altos niveles de expresión de RS1 panretiniana de fotorreceptores en la retina. La expresión de RS1 conduce a morfología mejorada de la retina con un descenso en el número y tamaño de cavidades en la retina como se ve en la imagen por tomografía de coherencia óptica de dominio espectral (SD-OCT) (Figuras 7A-I), un rescate de la onda b de ERG (Figuras 8A-D), y conservación estructural a largo plazo de la retina (Figuras 9A-E).
- 20 Figuras 7A-I. Imágenes de SD-OCT de alta resolución representativas de retinas inyectadas con 7m8-rho-GFP (columna izquierda), 7m8-rho-RS1 (columna del medio), o animales de tipo natural no inyectados (columna derecha). Se tomaron imágenes del fondo a través de la capa nuclear interna de la retina superior y excluyen otras capas (a-c). Las imágenes transversales de la retina superior (d-f) e inferior (g-i) se tomaron usando la cabeza del nervio óptico como punto de referencia.
- 25 25 La retina RS1 no tratada incrementa en general el espesor cuando se mide desde la membrana limitante interna (MLI) a los fotorreceptores, como los progresos patológicos debido a la división por esquisis de la retina interna. Este proceso es distinto del observado en la mayoría de las enfermedades degenerativas de la retina (EDR) que no forman esquisis, pero presentan muerte progresiva de célula fotorreceptora en la CNI y estrechamiento
- 30 30 concomitante de retina y pérdida de amplitud de ERG. En RS1, la CNE se estrecha ya que los fotorreceptores mueren de la enfermedad, pero esto es distinto del cambio del espesor general de la retina. Generalmente se piensa que una terapia con éxito para RS1 volverá el espesor general de la retina al tipo natural y aliviará la pérdida de fotorreceptor en la CNE. En la mayoría de EDR aparte de RS1, la pérdida de fotorreceptores, marcados por el estrechamiento de la CNE, se iguala por un descenso en la producción fisiológica de retina medida por la amplitud
- 35 35 de ERG. RS1 es uno de los muy pocos ejemplos de una enfermedad de la retina en la que la patología incrementa el espesor de la retina con concomitante pérdida de amplitud de ERG. En resumen, restaurar el producto génico de RS1, un "pegamiento" de retina extracelular; - estrecha la parte de atrás de la retina al espesor de tipo natural y la amplitud de ERG vuelve a niveles normales cercanos ya que soluciona la esquisis.
- 40 40 La Figura 8a muestra una comparación de rescate funcional de ojos de Rslh-/- no tratados con ojos inyectados con VAA2-rho-RS1, 7m8-rho-GFP y 7m8-rho-RS1 tanto un mes (izquierda) como 4 meses (derecha) después de la inyección. Un mes después de la inyección, 7m8-rho-RS1 condujo a rescate considerable de la amplitud de onda b de ERG, mientras que VAA2-rho.RS1 era estadísticamente indistinguible de los ojos no tratados.
- 45 45 Despues de 4 meses, la amplitud de 7m8-rho-RS1 se incrementa más hacia la amplitud de tipo natural (derecha). La Figura 8b muestra que rastros de ERG representativos de ojos inyectados con 7m8-rho-RS1 muestran amplitud mejorada de la onda a y onda b y una forma de onda más cercana a los ojos de tipo natural, en comparación con los ojos inyectados con 7m8-rho-GFP. La Figura 8c muestra la amplitud de la onda b escotópica de campo completo resultante de un estímulo de alta intensidad ($1 \text{ log cd} \times \text{s/m}^2$) registrada sobre una base mensual comenzando un mes después de la inyección en P15 para cada condición. Se registraron tres respuestas y se calculó la media para cada ojo en cada momento.
- 55 55 Las amplitudes medias de la onda b de ERG se trazaron como una función del momento después de la inyección. n=7 se usó para ambas condiciones. La Figura 8d muestra un análisis de las respuestas de ERG bajo condiciones escotópicas (rastros superiores, intervalo del estímulo desde -3 a 1 log cd x s/m²) y fotópicas (rastros inferiores, intervalo desde -0,9 a 1,4 log cd x s/m²) indica función mejorada de bastón y cono durante un intervalo de intensidades de estímulos.
- 60 60 Figuras 9A-E. Mejoras constantes en el espesor de la retina medido a los 10 meses después del tratamiento con 7m8-rho-RS1. Imágenes de SD-OCT transversales representativas de retinas tratadas con a) 7m8-rho-RS1 o b) o 7m8-rho-GFP 10 meses después de la inyección centradas en la cabeza del nervio óptico. Medidas de c) espesor de la retina, d) espesor de CNE, y e) espesor del segmento interior y exterior se trazan como una función de la distancia desde la cabeza del nervio óptico.

Ejemplo 3: variante de VAA usada para administrar una proteína a células retinianas en el macaco

Se generó un virión de VAA2 recombinante (7m8 que lleva GFP bajo el control de un promotor de conexina 36). El virión de VAA2 recombinante incluyó una variante proteína de la cápside de VAA con una inserción de péptido 5 LALGETTRPA entre los aminoácidos 587 y 588 de la cápside de VAA2, y GFP bajo control transcripcional de un promotor de conexina 36, que se expresa en interneuronas. El virión de VAA2 se inyectó de manera intravítreo en el ojo de un macaco. Los datos se muestran en la Figura 18.

La Figura 18 proporciona una imagen de fluorescencia del fondo que muestra la expresión de GFP en la parte de 10 atrás de la retina 9 semanas después de la administración de 7m8 que lleva GFP bajo el control de un promotor de conexina 36. En comparación con el serotipo de VAA2 parental (Yin y col, *IOVS* 52(5); 2775), se vio un nivel superior de expresión en el anillo foveal, y se vio fluorescencia visible en la retina central fuera de la fóvea.

Referencias

- 15 Daiger S.P., Bowne S.J., Sullivan L.S. (2007) "Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa". *Arch Ophthalmol* 125:151-158.
- 10 Dalkara D., Kolstad K.D., Caporale N., Visel M., Klimczak R.R., y col. (2009) "Inner Limiting Membrane Barriers to AAV Mediated Retinal Transduction from the Vitreous". *Mol. Ther.*
- 20 Den Hollander A.J., Roepman R., Koenekoop R.K., Cremers F.P. (2008) "Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms". *Prog. Retin. Eye Res.* 27:391-419.
- 25 Gruter O., Kostic C., Crippa S.V., Perez M.T., Zografos L., y col. (2005) "Lentiviral vector-mediated gene transfer in adult mouse photoreceptors is impaired by the presence of a physical barrier". *Gene Ther.* 12:942-947.
- 30 Maguire A.M., Simonelli F., Pierce E.A., Pugh E.N., Jr., Mingozi F., y col. (2008) "Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis". *N. Engl. J. Med.* 358:2.240-2.248.
- 35 Mancuso K., Hauswirth W.W., Li Q., Connor T.B., Kuchenbecker J.A., y col. (2009) "Gene therapy for red-green colour blindness in adult primates". *Nature* 461:784-787.
- 40 McGee Sanftner L.H., Abel H., Hauswirth W.W., Flannery J.G. (2001) "Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa". *Mol. Ther.* 4:622-629.
- 45 Muller O.J., Kaul F., Weitzman M.D., Pasqualini R., Arap W., y col. (2003) "Random peptide libraries displayed on adenoassociated virus to select for targeted gene therapy vectors". *Nat. Biotechnol.* 21:1.040-1.046.
- 50 Nakazawa T. y col. (2007) "Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin". *Invest. Ophthalmol Vis. Sci.* 48:2.760-8.
- 55 Nakazawa T. y col. (2006) "Characterization of cytokine responses to retinal detachment in rats". *Mol. Vis.* 12:867-78.
- 60 Perabo L., Buning H., Kofler D.M., Ried M.U., Girod A., y col. (2003) "In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display". *Mol. Ther.* 8:151-157.
- 65 Petrus-Silva H., Dinculescu A., Li Q., Min S.H., Chiodo V., y col. (2009) "High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant VAA serotype vectors". *Mol. Ther.* 17:463-471.
- 70 Reme CE, Grimm C., Hafezi F., Wenzel A., Williams T.P. (2000) "Apoptosis in the Retina: The Silent Death of Vision". *News Physiol. Sci.* 15:120-124.
- 75 Rolling F. (2004) "Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives". *Gene Ther.* 11 Suppl 1:S26-32.
- 80 Wensel T.G., Gross A.K., Chan F., Sykoudis K., Wilson J.H. (2005) "Rhodopsin-EGFP knock-ins for imaging quantal gene alterations". *Vision Res.* 45:3.445-3.453.
- 85 Zhong L., Li B., Mah C.S., Govindasamy L., Agbandje-McKenna M., y col. (2008) "Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:7.827-7.832.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

- 55 <110> Schaffer, David V.
 Klimczak, Ryan R.
 Koerber, James T.
 Flannery, John G.
 Dalkara Mourot, Deniz
 Visel, Meike
 Byrne, Leah C.T.
- 60 <120> Viriones de virus adenoasociado con cápside variante y métodos para su uso
- 65 <130> BERK-160WO
- <150> 61/478.355
 <151> 22-04-2011

<160> 64

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1

<211> 733

<212> PRT

<213> Virus Adeno-asociado-2

10 <400> 1

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

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

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

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

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

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

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

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

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

ES 2 638 342 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser

ES 2 638 342 T3

385

390

395

400

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr
 580 585 590

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

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

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

ES 2 638 342 T3

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

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

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

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

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

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

<210> 2

<211> 42

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-2

<400> 2

Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg
1 5 10 15

Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu
20 25 30

10 Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
35 40

<210> 3

<211> 42

15 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-VAA-1

<400> 3

Pro Val Ala Thr Glu Arg Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser
1 5 10 15

Ser Ser Thr Asp Pro Ala Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu
20 25 30

20 Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
35 40

<210> 4

<211> 42

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-5

<400> 4

Arg Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser
1 5 10 15

Ser Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val
20 25 30

Pro Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val
35 40

<210> 5

<211> 42

<212> PRT

10 <213> Virus adeno-asociado-VAA-6

<400> 5

Pro Val Ala Thr Glu Arg Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser
1 5 10 15

Ser Ser Thr Asp Pro Ala Thr Gly Asp Val His Val Met Gly Ala Leu
20 25 30

Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
35 40

15

<210> 6

<211> 42

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-VAA-

20

<400> 6

Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ser Ser Asn Leu Gln Ala
1 5 10 15

Ala Asn Thr Ala Ala Gln Thr Gln Val Val Asn Asn Gln Gly Ala Leu
20 25 30

Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val
35 40

25

<210> 7

<211> 42

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-VAA-8

30

<400> 7

Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln
 1 5 10 15

Gln Asn Thr Ala Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu
 20 25 30

Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val
 35 40

<210> 8

<211> 42

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-VAA-9

<400> 8

Pro Val Ala Thr Glu Ser Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser
 1 5 10 15

Ala Gln Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu
 20 25 30

10 Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val
 35 40

<210> 9

<211> 42

15 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-VAA-10

<400> 9

Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln
 1 5 10 15

Ala Asn Thr Gly Pro Ile Val Gly Asn Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu
 20 25 30

20 Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val
 35 40

<210> 10

<211> 224

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

Met Ser Arg Lys Ile Glu Gly Phe Leu Leu Leu Leu Phe Gly Tyr
 1 5 10 15

Glu Ala Thr Leu Gly Leu Ser Ser Thr Glu Asp Glu Gly Glu Asp Pro
 20 25 30

Trp Tyr Gln Lys Ala Cys Lys Cys Asp Cys Gln Gly Gly Pro Asn Ala
 35 40 45

Leu Trp Ser Ala Gly Ala Thr Ser Leu Asp Cys Ile Pro Glu Cys Pro
 50 55 60

Tyr His Lys Pro Leu Gly Phe Glu Ser Gly Glu Val Thr Pro Asp Gln
 65 70 75 80

Ile Thr Cys Ser Asn Pro Glu Gln Tyr Val Gly Trp Tyr Ser Ser Trp
 85 90 95

Thr Ala Asn Lys Ala Arg Leu Asn Ser Gln Gly Phe Gly Cys Ala Trp
 100 105 110

Leu Ser Lys Phe Gln Asp Ser Ser Gln Trp Leu Gln Ile Asp Leu Lys
 115 120 125

Glu Ile Lys Val Ile Ser Gly Ile Leu Thr Gln Gly Arg Cys Asp Ile
 130 135 140

Asp Glu Trp Met Thr Lys Tyr Ser Val Gln Tyr Arg Thr Asp Glu Arg
 145 150 155 160

Leu Asn Trp Ile Tyr Tyr Lys Asp Gln Thr Gly Asn Asn Arg Val Phe
 165 170 175

Tyr Gly Asn Ser Asp Arg Thr Ser Thr Val Gln Asn Leu Leu Arg Pro
 180 185 190

Pro Ile Ile Ser Arg Phe Ile Arg Leu Ile Pro Leu Gly Trp His Val
 195 200 205

Arg Ile Ala Ile Arg Met Glu Leu Leu Glu Cys Val Ser Lys Cys Ala
 210 215 220

<210> 11
 <211> 247

5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

ES 2 638 342 T3

Met Thr Ile Leu Phe Leu Thr Met Val Ile Ser Tyr Phe Gly Cys Met
1 5 10 15

Lys Ala Ala Pro Met Lys Glu Ala Asn Ile Arg Gly Gln Gly Gly Leu
20 25 30

Ala Tyr Pro Gly Val Arg Thr His Gly Thr Leu Glu Ser Val Asn Gly
35 40 45

Pro Lys Ala Gly Ser Arg Gly Leu Thr Ser Leu Ala Asp Thr Phe Glu
50 55 60

His Val Ile Glu Glu Leu Leu Asp Glu Asp His Lys Val Arg Pro Asn
65 70 75 80

Glu Glu Asn Asn Lys Asp Ala Asp Leu Tyr Thr Ser Arg Val Met Leu
85 90 95

Ser Ser Gln Val Pro Leu Glu Pro Pro Leu Leu Phe Leu Leu Glu Glu
100 105 110

Tyr Lys Asn Tyr Leu Asp Ala Ala Asn Met Ser Met Met Val Leu Arg
115 120 125

His Ser Asp Pro Ala Arg Arg Gly Glu Leu Ser Val Cys Asp Ser Ile
130 135 140

Ser Glu Trp Val Thr Ala Ala Asp Lys Lys Thr Ala Val Asp Met Ser
145 150 155 160

Gly Gly Thr Val Thr Val Leu Glu Lys Val Pro Val Ser Lys Gly Gln
165 170 175

Leu Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Lys Cys Asn Pro Met Gly Tyr Thr
180 185 190

Lys Glu Gly Cys Arg Gly Ile Asp Lys Arg His Trp Asn Ser Gln Cys
195 200 205

Arg Thr Thr Gln Ser Tyr Val Arg Ala Leu Thr Met Asp Ser Lys Lys
210 215 220

Arg Ile Gly Trp Arg Phe Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Thr
225 230 235 240

Leu Thr Ile Lys Arg Gly Arg
245

<210> 12
<211> 533
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 12

ES 2 638 342 T3

Met Ser Ile Gln Val Glu His Pro Ala Gly Gly Tyr Lys Lys Leu Phe
1 5 10 15

Glu Thr Val Glu Glu Leu Ser Ser Pro Leu Thr Ala His Val Thr Gly
20 25 30

Arg Ile Pro Leu Trp Leu Thr Gly Ser Leu Leu Arg Cys Gly Pro Gly
35 40 45

Leu Phe Glu Val Gly Ser Glu Pro Phe Tyr His Leu Phe Asp Gly Gln
50 55 60

Ala Leu Leu His Lys Phe Asp Phe Lys Glu Gly His Val Thr Tyr His
65 70 75 80

Arg Arg Phe Ile Arg Thr Asp Ala Tyr Val Arg Ala Met Thr Glu Lys
85 90 95

Arg Ile Val Ile Thr Glu Phe Gly Thr Cys Ala Phe Pro Asp Pro Cys
100 105 110

Lys Asn Ile Phe Ser Arg Phe Phe Ser Tyr Phe Arg Gly Val Glu Val
115 120 125

Thr Asp Asn Ala Leu Val Asn Val Tyr Pro Val Gly Glu Asp Tyr Tyr
130 135 140

Ala Cys Thr Glu Thr Asn Phe Ile Thr Lys Ile Asn Pro Glu Thr Leu
145 150 155 160

Glu Thr Ile Lys Gln Val Asp Leu Cys Asn Tyr Val Ser Val Asn Gly
165 170 175

Ala Thr Ala His Pro His Ile Glu Asn Asp Gly Thr Val Tyr Asn Ile
180 185 190

Gly Asn Cys Phe Gly Lys Asn Phe Ser Ile Ala Tyr Asn Ile Val Lys
195 200 205

Ile Pro Pro Leu Gln Ala Asp Lys Glu Asp Pro Ile Ser Lys Ser Glu
210 215 220

Ile Val Val Gln Phe Pro Cys Ser Asp Arg Phe Lys Pro Ser Tyr Val
225 230 235 240

His Ser Phe Gly Leu Thr Pro Asn Tyr Ile Val Phe Val Glu Thr Pro

ES 2 638 342 T3

245

250

255

Val Lys Ile Asn Leu Phe Lys Phe Leu Ser Ser Trp Ser Leu Trp Gly
 260 265 270

Ala Asn Tyr Met Asp Cys Phe Glu Ser Asn Glu Thr Met Gly Val Trp
 275 280 285

Leu His Ile Ala Asp Lys Lys Arg Lys Lys Tyr Leu Asn Asn Lys Tyr
 290 295 300

Arg Thr Ser Pro Phe Asn Leu Phe His His Ile Asn Thr Tyr Glu Asp
 305 310 315 320

Asn Gly Phe Leu Ile Val Asp Leu Cys Cys Trp Lys Gly Phe Glu Phe
 325 330 335

Val Tyr Asn Tyr Leu Tyr Leu Ala Asn Leu Arg Glu Asn Trp Glu Glu
 340 345 350

Val Lys Lys Asn Ala Arg Lys Ala Pro Gln Pro Glu Val Arg Arg Tyr
 355 360 365

Val Leu Pro Leu Asn Ile Asp Lys Ala Asp Thr Gly Lys Asn Leu Val
 370 375 380

Thr Leu Pro Asn Thr Thr Ala Thr Ala Ile Leu Cys Ser Asp Glu Thr
 385 390 395 400

Ile Trp Leu Glu Pro Glu Val Leu Phe Ser Gly Pro Arg Gln Ala Phe
 405 410 415

Glu Phe Pro Gln Ile Asn Tyr Gln Lys Tyr Cys Gly Lys Pro Tyr Thr
 420 425 430

Tyr Ala Tyr Gly Leu Gly Leu Asn His Phe Val Pro Asp Arg Leu Cys
 435 440 445

Lys Leu Asn Val Lys Thr Lys Glu Thr Trp Val Trp Gln Glu Pro Asp
 450 455 460

Ser Tyr Pro Ser Glu Pro Ile Phe Val Ser His Pro Asp Ala Leu Glu
 465 470 475 480

Glu Asp Asp Gly Val Val Leu Ser Val Val Val Ser Pro Gly Ala Gly
 485 490 495

Gln Lys Pro Ala Tyr Leu Leu Ile Leu Asn Ala Lys Asp Leu Ser Glu
 500 505 510

Val Ala Arg Ala Glu Val Glu Ile Asn Ile Pro Val Thr Phe His Gly
 515 520 525

Leu Phe Lys Lys Ser
 530

<210> 13

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

10 <400> 13

Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro
 1 5

15 <210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 14

Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro
 1 5

25

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

35 <400> 15

Lys Ala Gly Gln Ala Asn Asn
 1 5

40 <210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 16

Lys Asp Pro Lys Thr Thr Asn
 1 5

50

	<210> 17	
	<211> 27	
	<212> RNA	
	<213> Secuencia artificial	
5		
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sintético	
10	<400> 17	
	cgcaaucagu gaaugcuaau acauccg	27
	<210> 18	
	<211> 5541	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Construcción sintética	
20	<400> 18	
	agcttggatc caatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact ggtattctta	60
	actatgttgc tccttttacg ctatgtggat acgctgcttt aatgcctttg tatcatgcta	120
	ttgcttcccg tatggctttc attttctctt ccttgtataa atcctggttg ctgtctcttt	180
	atgaggagtt gtggcccggt gtcaggcaac gtggcgtgggt gtgcactgtg tttgtgacg	240
	caaccccccac tggttggggc attgccacca cctgtcagct ctttccggg actttcgctt	300
	tcccccctccc tattgccacg gcgaaactca tcgccccctg ctttgcggc tgctggacag	360
	gggctcggct gttgggcact gacaattccg tgggtttgtc gggaaagctg acgtccttcc	420
	catggctgct cgcctgtgtt gccacctgga ttctgcgcgg gacgtccttc tgctacgtcc	480
	cttcggccct caatccagcg gaccttcctt cccgcggact gctgccggct ctgcggccctc	540
	ttccgcgtct tcgagatctg cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgcgtt	600
	ccccctccccc gtgccttcct tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata	660
	aaatgaggaa attgcategc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggt	720
	ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcatgctg gggactcgag	780
	ttaaggggcga attcccgatt aggatcttcc tagagcatgg ctacgtagat aagtagcatg	840
	gcgggttaat cattaactac aaggaacccc tagtgtatgga gttggccact ccctctctgc	900
	gcgcctcgctc gctcaactgag gccgggcgac caaaggtcgc ccgacgcccc ggctttgccc	960
	gggcggccctc agtgagcggag cgagcgcgca gccttaattta acctaattca ctggccgtcg	1020
	ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc cttgcagcac	1080
	atcccccttt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc ctttcccaac	1140

agttgcgcag cctgaatggc gaatgggacg cgccctgttag cggcgccatta agcgccggcgg	1200
gtgtgggtgt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgcagc cgccctagcg cccgctcctt	1260
tcgccttctt cccttcctt ctcgcacgt tcgcccgtt tccccgtcaa gctctaaatc	1320
gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg	1380
attagggtga tggttcacgt agtggccat cgcccccata gacggttttt cgccctttga	1440
cgctggagtt cacgttcctc aatagtggac tcttgcacca aactggaaca acactcaacc	1500
ctatctcggt ctattctttt gatttataag ggattttcc gatttcggcc tattggttaa	1560
aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa caaaatatta acgtttataa	1620
tttcaggtgg catcttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgcattt ttttctaaa	1680
tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt	1740
aaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc tttttgcgg	1800
cattttgcct teetgtttt gcteacccag aaacgctgtt gaaagtaaaa gatgctgaag	1860
atcagttggg tgcacgagtg gttacatcg aactggatct caatagtggt aagatccttg	1920
agagtttccg ccccgaaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgt	1980
gcgccgtatt atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact cggtcgcccgc atacactatt	2040
ctcagaatga ctgggtttag tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga	2100
cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaacttac	2160
ttctgacaac gatcgagga ccgaaggagc taaccgcctt tttgcacaac atgggggatc	2220
atgtaactcg ccttgatcgt tggaaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc	2280
gtgacaccac gatgcctgta gtaatggtaa caacgttgcg caaactattt actggcgaac	2340
tacttactct agcttcccg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag	2400
gaccacttct gcgctcgccc cttccggctg gctggtttat tgctgataaaa tctggagccg	2460
gtgagcgtgg gtctcgccgt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgta	2520
tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg	2580
ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata	2640
tacttttagat tgataaaaa cttcattttt aattaaaaag gatctaggtg aagatccttt	2700
ttgataatct catgaccaaa atcccttaac gtgagtttc gttccactga gctgcagacc	2760
ccgtagaaaa gatcaaagga tcttctttag atccttttt tctgcgcgta atctgctgt	2820
tgcaaacaaa aaaaccaccc ctaccagcgg tggttgttt gccggatcaa gagctaccaa	2880
ctcttttcc gaaggttaact ggcttcagca gagcgccagat accaaatact gtccttctag	2940
tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtacg accgcctaca tacctcgctc	3000

ES 2 638 342 T3

tgctaattcct	gttaccagtg	gctgctgcca	gtggcgataa	gtcggttctt	accgggttgg	3060
actcaagacg	atagttacccg	gataaggcgc	agcggtcggg	ctgaacgggg	ggttcgtgca	3120
cacagccca	cttggagcga	acgacactaca	ccgaactgag	atacctacag	cgtgagctat	3180
gagaaaagcgc	cacgcttccc	gaagggagaa	aggcggacag	gtatccggta	agcggcaggg	3240
tcggaacagg	agagcgcacg	agggagcttc	cagggggaaa	cgcctggtat	ctttatagtc	3300
ctgtcggtt	tcgcccaccc	tgacttgagc	gtcgattttt	gtgatgctcg	tcaggggggc	3360
ggagcctatg	aaaaaacgcc	agcaacgcgg	ccttttacg	gttcctggcc	ttttgctgog	3420
gttttgctca	catgttcttt	cctgcgttat	cccctgatc	tgtggataac	cgtattaccc	3480
cctttgagtg	agctgatacc	gctcgccgca	gccgaacgac	cgagcgcagc	gagtcagtga	3540
gcgaggaagc	ggaagagcgc	ccaatacgca	aaccgcctct	ccccgcgcgt	tggccgattc	3600
attaatgcag	ctggcacgac	aggtttcccg	actggaaagc	gggcagttag	cgcaacgcaa	3660
ttaatgtgag	ttagctact	cattaggcac	cccaggctt	acactttatg	cttccggctc	3720
gtatgttg	tggaaattgtg	agcggataac	aatttcacac	aggaaacagc	tatgaccatg	3780
attacgccag	atttaattaa	ggctgcgcgc	tcgctcgctc	actgaggccg	cccgggcaaa	3840
gccccggcgt	cgggcgcacct	ttggtagccc	ggcctcagtg	agcgagcgcag	cgcgccagaga	3900
gggagtggcc	aactccatca	ctaggggttc	ctttagtta	atgattaacc	cgccatgcta	3960
cttatctacg	tagccatgct	ctaggaagat	cggaattcgc	ccttaagcta	gcagatcttc	4020
cccacctagc	cacctggcaa	actgctcctt	ctctcaaagg	cccaaacatg	gcctcccaga	4080
ctgcaaccccc	caggcagtca	ggccctgtct	ccacaacctc	acagccaccc	tggacggaat	4140
ctgcttcctc	ccacatttga	gtcctctca	gcccctgagc	tcctctggc	agggctgttt	4200
ctttccatct	ttgtattccc	agggcctgc	aaataaatgt	ttaatgaacg	aacaagagag	4260
tgaattccaa	ttccatgcaa	caaggattgg	gctcctggc	cctaggctat	gtgtctggca	4320
ccagaaaacgg	aagctgcagg	ttgcagcccc	tgccctcatg	gagctctcc	tgtcagagga	4380
gtgtggggac	tggatgactc	cagaggtaac	ttgtggggg	acgaacaggt	aaggggctgt	4440
gtgacgagat	gagagactgg	gagaataaac	cagaaagtct	ctagctgtcc	agaggacata	4500
gcacagaggc	ccatggccc	tattcaaac	ccaggccacc	agactgagct	gggaccttgg	4560
gacagacaag	tcatgcagaa	gttagggac	cttctctcc	cttttcctgg	atggatcctg	4620
agtaccttct	cctccctgac	ctcaggcttc	ctcctagtgt	caccttggcc	cctcttagaa	4680
gccaaattagg	ccctcagttt	ctgcagcggg	gattaatatg	attatgaaca	cccccaatct	4740
cccagatgct	gattcagcca	ggagcttagg	agggggaggt	cactttataa	gggtctgggg	4800
gggtcagaac	ccagagtcat	ccctgaatt	ctgcagatat	ccatcacact	ggcggccgcg	4860
ccaccatgtc	acgcaagata	gaaggctttt	tgttattact	tctctttggc	tatgaagcca	4920

cattgggatt atcgcttacc gaggatgaag gcgaggaccc ctggcacaa aaagcatgca	4980
agtgcgattt ccaaggagga cccaaatgctc tgggttgc aggtgccacc tccttggact	5040
gtataccaga atgcccataat cacaaggcctc tgggttgc gtcaggggag gtcacacccgg	5100
accagatcac ctgtatataac ccggagcagt atgtgggctg gtattcttag tggactgcaa	5160
acaaggcccg gctcaacagt caaggcttg ggtgtgcctg gctctccaag ttccaggaca	5220
gtagccagtg gttacagata gatctgaagg agatcaaagt gatttcaggg atccctaccc	5280
aggggcgctg tgacatcgat gagtggatga ccaagtacag cgtgcagtagc aggacccatg	5340
agcgcctgaa ctggatttac tacaaggacc agactggaaa caaccgggtc ttctatggca	5400
actcggaccg cacctccacg gttcagaacc tgctgcggcc ccccatcatc tcccgcttca	5460
tcggctcat cccgctgggc tggcacgtcc gcattgcat ccggatggag ctgctggagt	5520
gcgtcagcaa gtgtgcctga a	5541

<210> 19

<211> 346

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Met Ala Leu Leu Lys Val Lys Phe Asp Gln Lys Lys Arg Val Lys Leu	
1 5 10 15	

Ala Gln Gly Leu Trp Leu Met Asn Trp Phe Ser Val Leu Ala Gly Ile	
20 25 30	

Ile Ile Phe Ser Leu Gly Leu Phe Leu Lys Ile Glu Leu Arg Lys Arg	
35 40 45	

Ser Asp Val Met Asn Asn Ser Glu Ser His Phe Val Pro Asn Ser Leu	
50 55 60	

Ile Gly Met Gly Val Leu Ser Cys Val Phe Asn Ser Leu Ala Gly Lys	
65 70 75 80	

Ile Cys Tyr Asp Ala Leu Asp Pro Ala Lys Tyr Ala Arg Trp Lys Pro	
85 90 95	

Trp Leu Lys Pro Tyr Leu Ala Ile Cys Val Leu Phe Asn Ile Ile Leu	
100 105 110	

Phe Leu Val Ala Leu Cys Cys Phe Leu Leu Arg Gly Ser Leu Glu Asn	
115 120 125	

ES 2 638 342 T3

Thr Leu Gly Gln Gly Leu Lys Asn Gly Met Lys Tyr Tyr Arg Asp Thr
 130 135 140

Asp Thr Pro Gly Arg Cys Phe Met Lys Lys Thr Ile Asp Met Leu Gln
 145 150 155 160

Ile Glu Phe Lys Cys Cys Gly Asn Asn Gly Phe Arg Asp Trp Phe Glu
 165 170 175

Ile Gln Trp Ile Ser Asn Arg Tyr Leu Asp Phe Ser Ser Lys Glu Val
 180 185 190

Lys Asp Arg Ile Lys Ser Asn Val Asp Gly Arg Tyr Leu Val Asp Gly
 195 200 205

Val Pro Phe Ser Cys Cys Asn Pro Ser Ser Pro Arg Pro Cys Ile Gln
 210 215 220

Tyr Gln Ile Thr Asn Asn Ser Ala His Tyr Ser Tyr Asp His Gln Thr
 225 230 235 240

Glu Glu Leu Asn Leu Trp Val Arg Gly Cys Arg Ala Ala Leu Leu Ser
 245 250 255

Tyr Tyr Ser Ser Leu Met Asn Ser Met Gly Val Val Thr Leu Leu Ile
 260 265 270

Trp Leu Phe Glu Val Thr Ile Thr Ile Gly Leu Arg Tyr Leu Gln Thr
 275 280 285

Ser Leu Asp Gly Val Ser Asn Pro Glu Glu Ser Glu Ser Gln
 290 295 300

Gly Trp Leu Leu Glu Arg Ser Val Pro Glu Thr Trp Lys Ala Phe Leu
 305 310 315 320

Glu Ser Val Lys Lys Leu Gly Lys Gly Asn Gln Val Glu Ala Glu Gly
 325 330 335

Ala Asp Ala Gly Gln Ala Pro Glu Ala Gly
 340 345

<210> 20

<211> 470

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 20

ES 2 638 342 T3

Met Ser His His Pro Ser Gly Leu Arg Ala Gly Phe Ser Ser Thr Ser
1 5 10 15

Tyr Arg Arg Thr Phe Gly Pro Pro Pro Ser Leu Ser Pro Gly Ala Phe
20 25 30

Ser Tyr Ser Ser Ser Arg Phe Ser Ser Ser Arg Leu Leu Gly Ser
35 40 45

Ala Ser Pro Ser Ser Val Arg Leu Gly Ser Phe Arg Ser Pro Arg
50 55 60

Ala Gly Ala Gly Ala Leu Leu Arg Leu Pro Ser Glu Arg Leu Asp Phe
65 70 75 80

Ser Met Ala Glu Ala Leu Asn Gln Glu Phe Leu Ala Thr Arg Ser Asn
85 90 95

Glu Lys Gln Glu Leu Gln Glu Leu Asn Asp Arg Phe Ala Asn Phe Ile
100 105 110

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

Leu Ser Gln Ala Arg Gly Gln Glu Pro Ala Arg Ala Asp Gln Leu Cys
130 135 140

Gln Gln Glu Leu Arg Glu Leu Arg Arg Glu Leu Glu Leu Leu Gly Arg
145 150 155 160

Glu Arg Asp Arg Val Gln Val Glu Arg Asp Gly Leu Ala Glu Asp Leu
165 170 175

Ala Ala Leu Lys Gln Arg Leu Glu Glu Glu Thr Arg Lys Arg Glu Asp
180 185 190

Ala Glu His Asn Leu Val Leu Phe Arg Lys Asp Val Asp Asp Ala Thr
195 200 205

Leu Ser Arg Leu Glu Leu Glu Arg Lys Ile Glu Ser Leu Met Asp Glu
210 215 220

Ile Glu Phe Leu Lys Lys Leu His Glu Glu Leu Arg Asp Leu Gln
225 230 235 240

Val Ser Val Glu Ser Gln Gln Val Gln Gln Val Glu Val Glu Ala Thr
245 250 255

ES 2 638 342 T3

Val Lys Pro Glu Leu Thr Ala Ala Leu Arg Asp Ile Arg Ala Gln Tyr
260 265 270

Glu Ser Ile Ala Ala Lys Asn Leu Gln Glu Ala Glu Glu Trp Tyr Lys
275 280 285

Ser Lys Tyr Ala Asp Leu Ser Asp Ala Ala Asn Arg Asn His Glu Ala
290 295 300

Leu Arg Gln Ala Lys Gln Glu Met Asn Glu Ser Arg Arg Gln Ile Gln
305 310 315 320

Ser Leu Thr Cys Glu Val Asp Gly Leu Arg Gly Thr Asn Glu Ala Leu
325 330 335

Leu Arg Gln Leu Arg Glu Leu Glu Glu Gln Phe Ala Leu Glu Ala Gly
340 345 350

Gly Tyr Gln Ala Gly Ala Ala Arg Leu Glu Glu Leu Arg Gln Leu
355 360 365

Lys Glu Glu Met Ala Arg His Leu Arg Glu Tyr Gln Glu Leu Leu Asn
370 375 380

Val Lys Met Ala Leu Asp Ile Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Lys Leu Leu
385 390 395 400

Glu Gly Glu Glu Ser Arg Ile Ser Val Pro Val His Ser Phe Ala Ser
405 410 415

Leu Asn Ile Lys Thr Thr Val Pro Glu Val Glu Pro Pro Gln Asp Ser
420 425 430

His Ser Arg Lys Thr Val Leu Ile Lys Thr Ile Glu Thr Arg Asn Gly
435 440 445

Glu Val Val Thr Glu Ser Gln Lys Glu Gln Arg Ser Glu Leu Asp Lys
450 455 460

Ser Ser Ala His Ser Tyr
465 470

<210> 21

<211> 1286

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<400> 21

ES 2 638 342 T3

Met Ser His Leu Val Asp Pro Thr Ser Gly Asp Leu Pro Val Arg Asp
1 5 10 15

Ile Asp Ala Ile Pro Leu Val Leu Pro Ala Ser Lys Gly Lys Asn Met
20 25 30

Lys Thr Gln Pro Pro Leu Ser Arg Met Asn Arg Glu Glu Leu Glu Asp
35 40 45

Ser Phe Phe Arg Leu Arg Glu Asp His Met Leu Val Lys Glu Leu Ser
50 55 60

Trp Lys Gln Gln Asp Glu Ile Lys Arg Leu Arg Thr Thr Leu Leu Arg
65 70 75 80

Leu Thr Ala Ala Gly Arg Asp Leu Arg Val Ala Glu Glu Ala Ala Pro
85 90 95

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

Leu Ser Met His Gln Arg Pro Gln Met His Arg Leu Gln Gly His Phe
115 120 125

His Cys Val Gly Pro Ala Ser Pro Arg Arg Ala Gln Pro Arg Val Gln
130 135 140

Val Gly His Arg Gln Leu His Thr Ala Gly Ala Pro Val Pro Glu Lys
145 150 155 160

Pro Lys Arg Gly Pro Arg Asp Arg Leu Ser Tyr Thr Ala Pro Pro Ser
165 170 175

Phe Lys Glu His Ala Thr Asn Glu Asn Arg Gly Glu Val Ala Ser Lys
180 185 190

Pro Ser Glu Leu Val Ser Gly Ser Asn Ser Ile Ile Ser Phe Ser Ser
195 200 205

Val Ile Ser Met Ala Lys Pro Ile Gly Leu Cys Met Pro Asn Ser Ala
210 215 220

His Ile Met Ala Ser Asn Thr Met Gln Val Glu Glu Pro Pro Lys Ser
225 230 235 240

Pro Glu Lys Met Trp Pro Lys Asp Glu Asn Phe Glu Gln Arg Ser Ser
245 250 255

ES 2 638 342 T3

Leu Glu Cys Ala Gln Lys Ala Ala Glu Leu Arg Ala Ser Ile Lys Glu
260 265 270

Lys Val Glu Leu Ile Arg Leu Lys Lys Leu Leu His Glu Arg Asn Ala
275 280 285

Ser Leu Val Met Thr Lys Ala Gln Leu Thr Glu Val Gln Glu Ala Tyr
290 295 300

Glu Thr Leu Leu Gln Lys Asn Gln Gly Ile Leu Ser Ala Ala His Glu
305 310 315 320

Ala Leu Leu Lys Gln Val Asn Glu Leu Arg Ala Glu Leu Lys Glu Glu
325 330 335

Ser Lys Lys Ala Val Ser Leu Lys Ser Gln Leu Glu Asp Val Ser Ile
340 345 350

Leu Gln Met Thr Leu Lys Glu Phe Gln Glu Arg Val Glu Asp Leu Glu
355 360 365

Lys Glu Arg Lys Leu Leu Asn Asp Asn Tyr Asp Lys Leu Leu Glu Ser
370 375 380

Met Leu Asp Ser Ser Asp Ser Ser Gln Pro His Trp Ser Asn Glu
385 390 395 400

Leu Ile Ala Glu Gln Leu Gln Gln Val Ser Gln Leu Gln Asp Gln
405 410 415

Leu Asp Ala Glu Leu Glu Asp Lys Arg Lys Val Leu Glu Leu Ser
420 425 430

Arg Glu Lys Ala Gln Asn Glu Asp Leu Lys Leu Glu Val Thr Asn Ile
435 440 445

Leu Gln Lys His Lys Gln Glu Val Glu Leu Leu Gln Asn Ala Ala Thr
450 455 460

Ile Ser Gln Pro Pro Asp Arg Gln Ser Glu Pro Ala Thr His Pro Ala
465 470 475 480

Val Leu Gln Glu Asn Thr Gln Ile Glu Pro Ser Glu Pro Lys Asn Gln
485 490 495

Glu Glu Lys Lys Leu Ser Gln Val Leu Asn Glu Leu Gln Val Ser His

ES 2 638 342 T3

500

505

510

Ala Glu Thr Thr Leu Glu Leu Glu Lys Thr Arg Asp Met Leu Ile Leu
 515 520 525

Gln Arg Lys Ile Asn Val Cys Tyr Gln Glu Glu Leu Glu Ala Met Met
 530 535 540

Thr Lys Ala Asp Asn Asp Asn Arg Asp His Lys Glu Lys Leu Glu Arg
 545 550 555 560

Leu Thr Arg Leu Leu Asp Leu Lys Asn Asn Arg Ile Lys Gln Leu Glu
 565 570 575

Gly Ile Leu Arg Ser His Asp Leu Pro Thr Ser Glu Gln Leu Lys Asp
 580 585 590

Val Ala Tyr Gly Thr Arg Pro Leu Ser Leu Cys Leu Glu Thr Leu Pro
 595 600 605

Ala His Gly Asp Glu Asp Lys Val Asp Ile Ser Leu Leu His Gln Gly
 610 615 620

Glu Asn Leu Phe Glu Leu His Ile His Gln Ala Phe Leu Thr Ser Ala
 625 630 635 640

Ala Leu Ala Gln Ala Gly Asp Thr Gln Pro Thr Thr Phe Cys Thr Tyr
 645 650 655

Ser Phe Tyr Asp Phe Glu Thr His Cys Thr Pro Leu Ser Val Gly Pro
 660 665 670

Gln Pro Leu Tyr Asp Phe Thr Ser Gln Tyr Val Met Glu Thr Asp Ser
 675 680 685

Leu Phe Leu His Tyr Leu Gln Glu Ala Ser Ala Arg Leu Asp Ile His
 690 695 700

Gln Ala Met Ala Ser Glu His Ser Thr Leu Ala Ala Gly Trp Ile Cys
 705 710 715 720

Phe Asp Arg Val Leu Glu Thr Val Glu Lys Val His Gly Leu Ala Thr
 725 730 735

Leu Ile Gly Ala Gly Gly Glu Phe Gly Val Leu Glu Tyr Trp Met
 740 745 750

ES 2 638 342 T3

Arg Leu Arg Phe Pro Ile Lys Pro Ser Leu Gln Ala Cys Asn Lys Arg
755 760 765

Lys Lys Ala Gln Val Tyr Leu Ser Thr Asp Val Leu Gly Gly Arg Lys
770 775 780

Ala Gln Glu Glu Glu Phe Arg Ser Glu Ser Trp Glu Pro Gln Asn Glu
785 790 795 800

Leu Trp Ile Glu Ile Thr Lys Cys Cys Gly Leu Arg Ser Arg Trp Leu
805 810 815

Gly Thr Gln Pro Ser Pro Tyr Ala Val Tyr Arg Phe Phe Thr Phe Ser
820 825 830

Asp His Asp Thr Ala Ile Ile Pro Ala Ser Asn Asn Pro Tyr Phe Arg
835 840 845

Asp Gln Ala Arg Phe Pro Val Leu Val Thr Ser Asp Leu Asp His Tyr
850 855 860

Leu Arg Arg Glu Ala Leu Ser Ile His Val Phe Asp Asp Glu Asp Leu
865 870 875 880

Glu Pro Gly Ser Tyr Leu Gly Arg Ala Arg Val Pro Leu Leu Pro Leu
885 890 895

Ala Lys Asn Glu Ser Ile Lys Gly Asp Phe Asn Leu Thr Asp Pro Ala
900 905 910

Glu Lys Pro Asn Gly Ser Ile Gln Val Gln Leu Asp Trp Lys Phe Pro
915 920 925

Tyr Ile Pro Pro Glu Ser Phe Leu Lys Pro Glu Ala Gln Thr Lys Gly
930 935 940

Lys Asp Thr Lys Asp Ser Ser Lys Ile Ser Ser Glu Glu Glu Lys Ala
945 950 955 960

Ser Phe Pro Ser Gln Asp Gln Met Ala Ser Pro Glu Val Pro Ile Glu
965 970 975

Ala Gly Gln Tyr Arg Ser Lys Arg Lys Pro Pro His Gly Gly Glu Arg
980 985 990

Lys Glu Lys Glu His Gln Val Val Ser Tyr Ser Arg Arg Lys His Gly
995 1000 1005

ES 2 638 342 T3

Lys Arg Ile Gly Val Gln Gly Lys Asn Arg Met Glu Tyr Leu Ser
 1010 1015 1020

Leu Asn Ile Leu Asn Gly Asn Thr Pro Glu Gln Val Asn Tyr Thr
 1025 1030 1035

Glu Trp Lys Phe Ser Glu Thr Asn Ser Phe Ile Gly Asp Gly Phe
 1040 1045 1050

Lys Asn Gln His Glu Glu Glu Glu Met Thr Leu Ser His Ser Ala
 1055 1060 1065

Leu Lys Gln Lys Glu Pro Leu His Pro Val Asn Asp Lys Glu Ser
 1070 1075 1080

Ser Glu Gln Gly Ser Glu Val Ser Glu Ala Gln Thr Thr Asp Ser
 1085 1090 1095

Asp Asp Val Ile Val Pro Pro Met Ser Gln Lys Tyr Pro Lys Ala
 1100 1105 1110

Asp Ser Glu Lys Met Cys Ile Glu Ile Val Ser Leu Ala Phe Tyr
 1115 1120 1125

Pro Glu Ala Glu Val Met Ser Asp Glu Asn Ile Lys Gln Val Tyr
 1130 1135 1140

Val Glu Tyr Lys Phe Tyr Asp Leu Pro Leu Ser Glu Thr Glu Thr
 1145 1150 1155

Pro Val Ser Leu Arg Lys Pro Arg Ala Gly Glu Ile His Phe
 1160 1165 1170

His Phe Ser Lys Val Ile Asp Leu Asp Pro Gln Glu Gln Gln Gly
 1175 1180 1185

Arg Arg Arg Phe Leu Phe Asp Met Leu Asn Gly Gln Asp Pro Asp
 1190 1195 1200

Gln Gly His Leu Lys Phe Thr Val Val Ser Asp Pro Leu Asp Glu
 1205 1210 1215

Glu Lys Lys Glu Cys Glu Glu Val Gly Tyr Ala Tyr Leu Gln Leu
 1220 1225 1230

Trp Gln Ile Leu Glu Ser Gly Arg Asp Ile Leu Glu Gln Glu Leu
 1235 1240 1245

ES 2 638 342 T3

Asp Ile Val Ser Pro Glu Asp Leu Ala Thr Pro Ile Gly Arg Leu
 1250 1255 1260

Lys Val Ser Leu Gln Ala Ala Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Lys
 1265 1270 1275

Glu Met Thr Glu Asp Leu Phe Ser
 1280 1285

<210> 22

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-1

<400> 22

Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
 1 5 10 15

His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
 20 25 30

Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn
 35 40 45

Lys Asp Leu Leu Phe Ser Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln
 50 55 60

Pro Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser
 65 70 75 80

Lys Thr Lys Thr Asp Asn Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala
 85 90 95

Ser Lys Tyr Asn Leu Asn Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr
 100 105 110

Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser
 115 120 125

Gly Val Met Ile Phe Gly Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala
 130 135 140

Leu Asp Asn Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn
 145 150 155 160

Pro Val Ala Thr Glu Arg Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser
 165 170 175

ES 2 638 342 T3

Ser Ser Thr Asp Pro Ala Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu
 180 185 190

Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile
 195 200 205

Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu
 210 215 220

Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
 225 230 235 240

<210> 23

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-6

<400> 23

Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
 1 5 10 15

His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
 20 25 30

Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn
 35 40 45

Lys Asp Leu Leu Phe Ser Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln
 50 55 60

Pro Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser
 65 70 75 80

Lys Thr Lys Thr Asp Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala
 85 90 95

Ser Lys Tyr Asn Leu Asn Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr
 100 105 110

Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser
 115 120 125

Gly Val Met Ile Phe Gly Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala
 130 135 140

Leu Asp Asn Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn
 145 150 155 160

ES 2 638 342 T3

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

Ser Ser Thr Asp Pro Ala Thr Gly Asp Val His Val Met Gly Ala Leu
 180 185 190

Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile
 195 200 205

Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu
 210 215 220

Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
 225 230 235 240

<210> 24

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-3

<400> 24

Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His
 1 5 10 15

Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu
 20 25 30

Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr Gln Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Asn Gln
 35 40 45

Ser Arg Leu Leu Phe Ser Gln Ala Gly Pro Gln Ser Met Ser Leu Gln
 50 55 60

Ala Arg Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser
 65 70 75 80

Lys Thr Ala Asn Asp Asn Asn Ser Asn Phe Pro Trp Thr Ala Ala
 85 90 95

Ser Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro
 100 105 110

Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His
 115 120 125

Gly Asn Leu Ile Phe Gly Lys Glu Gly Thr Thr Ala Ser Asn Ala Glu
 130 135 140

Leu Asp Asn Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn
 145 150 155 160

Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gln Ser
 165 170 175

Ser Asn Thr Ala Pro Thr Thr Gly Thr Val Asn His Gln Gly Ala Leu
 180 185 190

Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile
 195 200 205

Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu
 210 215 220

Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Met Ile Lys
 225 230 235 240

<210> 25

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-2

<400> 25

Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His
 1 5 10 15

Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu
 20 25 30

Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Gln Ser
 35 40 45

Arg Leu Gln Phe Ser Gln Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser
 50 55 60

Arg Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys
 65 70 75 80

Thr Ser Ala Asp Asn Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr
 85 90 95

Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala
 100 105 110

Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly
 115 120 125

ES 2 638 342 T3

Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile
130 135 140

Glu Lys Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro
145 150 155 160

Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly
165 170 175

Asn Arg Gln Ala Ala Thr Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro
180 185 190

Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
195 200 205

Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met
210 215 220

Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
225 230 235 240

<210> 26

<211> 243

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-8

<400> 26

Asn Phe Gln Phe Thr Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser
1 5 10 15

Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp
20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala
35 40 45

Asn Thr Gln Thr Leu Gly Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala
50 55 60

Asn Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg
65 70 75 80

Val Ser Thr Thr Thr Gly Gln Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
85 90 95

Ala Gly Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro
100 105 110

Gly Ile Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro
 115 120 125

Ser Asn Gly Ile Leu Ile Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn
 130 135 140

Ala Asp Tyr Ser Asp Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr
 145 150 155 160

Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu
 165 170 175

Gln Gln Gln Asn Thr Ala Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly
 180 185 190

Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly
 195 200 205

Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser
 210 215 220

Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu
 225 230 235 240

Ile Lys Asn

<210> 27

<211> 243

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 27

Asn Phe Gln Phe Thr Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser
 1 5 10 15

Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp
 20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala
 35 40 45

Asn Thr Gln Thr Leu Gly Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala
 50 55 60

ES 2 638 342 T3

Asn Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg
65 70 75 80

Val Ser Thr Thr Gly Gln Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
85 90 95

Ala Gly Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro
100 105 110

Gly Ile Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro
115 120 125

Ser Asn Gly Ile Leu Ile Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn
130 135 140

Ala Asp Tyr Ser Asp Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr
145 150 155 160

Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu
165 170 175

Gln Gly Gln Arg Gln Ala Ala Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly
180 185 190

Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly
195 200 205

Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser
210 215 220

Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu
225 230 235 240

Ile Lys Asn

<210> 28

<211> 241

<212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-rh8

<400> 28

Phe Gln Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr
1 5 10 15

Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln
20 25 30

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Val Arg Thr Gln Thr Thr Gly Thr Gly Gly Thr
 35 40 45

Gln Thr Leu Ala Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ser Ser Met Ala Asn Gln
 50 55 60

Ala Arg Asn Trp Val Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser
 65 70 75 80

Thr Thr Thr Asn Gln Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala
 85 90 95

Ala Lys Phe Lys Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Met Asn Pro Gly Val
 100 105 110

Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser
 115 120 125

Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Asn Asp Gly Val Asp
 130 135 140

Tyr Ser Gln Val Leu Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn
 145 150 155 160

Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ala Val Ala Ile Asn Asn Gln Ala
 165 170 175

Ala Asn Thr Gln Ala Gln Thr Gly Leu Val His Asn Gln Gly Val Ile
 180 185 190

Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile
 195 200 205

Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu
 210 215 220

Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
 225 230 235 240

Asn

<210> 29
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Virus adeno-asociado-10
 <400> 29

ES 2 638 342 T3

Asn Phe Glu Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser
1 5 10 15

Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp
20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Gln
35 40 45

Gly Thr Gln Gln Leu Leu Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ala Asn Met Ser
50 55 60

Ala Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg
65 70 75 80

Val Ser Thr Thr Leu Ser Gln Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
85 90 95

Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro
100 105 110

Gly Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro
115 120 125

Ser Ser Gly Val Leu Met Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn
130 135 140

Val Asp Tyr Ser Ser Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr
145 150 155 160

Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu
165 170 175

Gln Gln Ala Asn Thr Gly Pro Ile Val Gly Asn Val Asn Ser Gln Gly
180 185 190

Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly
195 200 205

Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser
210 215 220

Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu
225 230 235 240

Ile Lys Asn

ES 2 638 342 T3

<210> 30
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Virus adeno-asociado-7

5

<400> 30

Phe	Glu	Phe	Ser	Tyr	Ser	Phe	Glu	Asp	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr
1															15

Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln
															30

Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Thr	Gln	Ser	Asn	Pro	Gly	Gly	Thr	Ala
															45

Gly	Asn	Arg	Glu	Leu	Gln	Phe	Tyr	Gln	Gly	Gly	Pro	Ser	Thr	Met	Ala
															50
															55
															60

Glu	Gln	Ala	Lys	Asn	Trp	Leu	Pro	Gly	Pro	Cys	Phe	Arg	Gln	Gln	Arg
															65
															70
															75
															80

Val	Ser	Lys	Thr	Leu	Asp	Gln	Asn	Asn	Ser	Asn	Phe	Ala	Trp	Thr	
															85
															90
															95

Gly	Ala	Thr	Lys	Tyr	His	Leu	Asn	Gly	Arg	Asn	Ser	Leu	Val	Asn	Pro
															100
															105
															110

Gly	Val	Ala	Met	Ala	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Glu	Asp	Arg	Phe	Phe	Pro
															115
															120
															125

Ser	Ser	Gly	Val	Leu	Ile	Phe	Gly	Lys	Thr	Gly	Ala	Thr	Asn	Lys	Thr
															130
															135
															140

Thr	Leu	Glu	Asn	Val	Leu	Met	Thr	Asn	Glu	Glu	Glu	Ile	Arg	Pro	Thr
															145
															150
															155
															160

Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Glu	Tyr	Gly	Ile	Val	Ser	Ser	Asn	Leu	Gln
															165
															170
															175

Ala	Ala	Asn	Thr	Ala	Ala	Gln	Thr	Gln	Val	Val	Asn	Asn	Gln	Gly	Ala
															180
															185
															190

Leu	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln	Asn	Arg	Asp	Val	Tyr	Leu	Gln	Gly	Pro
															195
															200
															205

Ile	Trp	Ala	Lys	Ile	Pro	His	Thr	Asp	Gly	Asn	Phe	His	Pro	Ser	Pro
															210
															215
															220

Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile
 225 230 235 240

Lys Asn

<210> 31

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-9

<400> 31

Phe Gln Phe Ser Tyr Glu Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr
 1 5 10 15

Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln
 20 25 30

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln
 35 40 45

Gln Thr Leu Lys Phe Ser Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln
 50 55 60

Gly Arg Asn Tyr Ile Pro Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser
 65 70 75 80

Thr Thr Val Thr Gln Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala
 85 90 95

Ser Ser Trp Ala Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro
 100 105 110

Ala Met Ala Ser His Lys Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser
 115 120 125

Gly Ser Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp
 130 135 140

Ala Asp Lys Val Met Ile Thr Asn Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn
 145 150 155 160

Pro Val Ala Thr Glu Ser Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser
 165 170 175

Ala Gln Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu
 180 185 190

Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile
 195 200 205

Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu
 210 215 220 225

Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
 225 230 235 240

<210> 32

<211> 239

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 32

Gln Phe Ser Tyr Glu Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
 1 5 10 15

His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
 20 25 30

Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln
 35 40 45

Thr Leu Lys Phe Ser Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly
 50 55 60

Arg Asn Tyr Ile Pro Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr
 65 70 75 80

Thr Val Thr Gln Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser
 85 90 95

Ser Trp Ala Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala
 100 105 110

Met Ala Ser His Lys Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly
 115 120 125

Ser Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala
 130 135 140

Asp Lys Val Met Ile Thr Asn Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro
 145 150 155 160

Val Ala Thr Glu Ser Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Gly
 165 170 175

Gln Ala Gln Ala Ala Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro
 180 185 190

Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
 195 200 205

Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met
 210 215 220

Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
 225 230 235

<210> 33

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Virus adeno-asociado-5

<400> 33

Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
 1 5 10 15

Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp
 20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
 35 40 45

Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
 50 55 60

Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly
 65 70 75 80

Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
 85 90 95

Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
 100 105 110

Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
 115 120 125

Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
 130 135 140

ES 2 638 342 T3

Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
145 150 155 160

Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser
165 170 175

Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro
180 185 190

Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp
195 200 205

Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met
210 215 220

Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn
225 230 235 240

<210> 34

<211> 250

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 34

Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
1 5 10 15

His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
20 25 30

Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn
35 40 45

Lys Asp Leu Leu Phe Ser Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln
50 55 60

Pro Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser
65 70 75 80

Lys Thr Lys Thr Asp Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala
85 90 95

Ser Lys Tyr Asn Leu Asn Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr
100 105 110

ES 2 638 342 T3

Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser
115 120 125

Gly Val Met Ile Phe Gly Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala
130 135 140

Leu Asp Asn Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn
145 150 155 160

Pro Val Ala Thr Glu Arg Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser
165 170 175

Ser Ser Thr Asp Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Pro Ala
180 185 190

Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
195 200 205

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
210 215 220

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
225 230 235 240

Lys Asn Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
245 250

<210> 35

<211> 250

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 35

Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
1 5 10 15

His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
20 25 30

Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn
35 40 45

Lys Asp Leu Leu Phe Ser Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln
50 55 60

Pro Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser

ES 2 638 342 T3

65	70	75	80
Lys Thr Lys Thr Asp Asn Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala			
85		90	95
Ser Lys Tyr Asn Leu Asn Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr			
100		105	110
Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser			
115		120	125
Gly Val Met Ile Phe Gly Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala			
130		135	140
Leu Asp Asn Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn			
145		150	155
160			
Pro Val Ala Thr Glu Arg Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser			
165		170	175
Ser Ser Thr Asp Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Pro Ala			
180		185	190
Thr Gly Asp Val His Val Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln			
195		200	205
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His			
210		215	220
Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu			
225		230	235
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys			
245		250	

5 <211> 230
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> Polipéptido sintético
15 <400> 36

ES 2 638 342 T3

Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His
1 5 10 15

Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu
20 25 30

Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Gln Ser
35 40 45

Arg Leu Gln Phe Ser Gln Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser
50 55 60

Arg Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys
65 70 75 80

Thr Ser Ala Asp Asn Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr
85 90 95

Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala
100 105 110

Met Ala Ser His Lys Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly
115 120 125

Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile
130 135 140

Glu Lys Val Met Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro
145 150 155 160

Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly
165 170 175

Asn Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Arg Gln Ala Ala Thr
180 185 190

Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
195 200 205

Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
210 215 220

Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
225 230 235 240

His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
245 250

<210> 37
<211> 253
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 37

10

ES 2 638 342 T3

Asn Phe Gln Phe Thr Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser
1 5 10 15

Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp
20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala
35 40 45

Asn Thr Gln Thr Leu Gly Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala
50 55 60

Asn Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg
65 70 75 80

Val Ser Thr Thr Thr Gly Gln Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
85 90 95

Ala Gly Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro
100 105 110

Gly Ile Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro
115 120 125

Ser Asn Gly Ile Leu Ile Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn
130 135 140

Ala Asp Tyr Ser Asp Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr
145 150 155 160

Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu
165 170 175

Gln Gln Gln Asn Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Thr Ala
180 185 190

Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
195 200 205

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
210 215 220

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
225 230 235 240

Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
245 250

<210> 38
 <211> 252
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10 <400> 38

Asn Phe Gln Phe Thr Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser
 1 5 10 15

Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp
 20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala
 35 40 45

Asn Thr Gln Thr Leu Gly Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala
 50 55 60

Asn Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg
 65 70 75 80

Val Ser Thr Thr Gly Gln Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
 85 90 95

Ala Gly Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro
 100 105 110

Gly Ile Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro
 115 120 125

Ser Asn Gly Ile Leu Ile Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn
 130 135 140

Ala Asp Tyr Ser Asp Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr
 145 150 155 160

Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu
 165 170 175

Gln Gly Gln Arg Gly Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Gln Ala Ala
 180 185 190

Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp
 195 200 205

Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro
 210 215 220

His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly
 225 230 235 240

Leu Lys His Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
 245 250

<210> 39

<211> 251

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 39

Phe Gln Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr
 1 5 10 15

Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln
 20 25 30

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Val Arg Thr Gln Thr Thr Gly Thr Gly Gly Thr
 35 40 45

Gln Thr Leu Ala Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ser Ser Met Ala Asn Gln
 50 55 60

Ala Arg Asn Trp Val Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser
 65 70 75 80

Thr Thr Thr Asn Gln Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala
 85 90 95

Ala Lys Phe Lys Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Met Asn Pro Gly Val
 100 105 110

Ala Met Ala Ser His Lys Asp Asp Asp Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser
 115 120 125

Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Asn Asp Gly Val Asp
 130 135 140

ES 2 638 342 T3

Tyr Ser Gln Val Leu Ile Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn
145 150 155 160

Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ala Val Ala Ile Asn Asn Gln Ala
165 170 175

Ala Asn Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Thr Gln Ala Gln
180 185 190

Thr Gly Leu Val His Asn Gln Gly Val Ile Pro Gly Met Val Trp Gln
195 200 205

Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
210 215 220

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
225 230 235 240

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
245 250

<210> 40

<211> 253

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 40

Asn Phe Glu Phe Ser Tyr Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser
1 5 10 15

Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp
20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Gln
35 40 45

Gly Thr Gln Gln Leu Leu Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ala Asn Met Ser
50 55 60

Ala Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg
65 70 75 80

Val Ser Thr Thr Leu Ser Gln Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
85 90 95

Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro

ES 2 638 342 T3

100

105

110

Gly Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro
115 120 125

Ser Ser Gly Val Leu Met Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn
130 135 140

Val Asp Tyr Ser Ser Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr
145 150 155 160

Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu
165 170 175

Gln Gln Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Ala Asn Thr Gly
180 185 190

Pro Ile Val Gly Asn Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
195 200 205

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
210 215 220

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
225 230 235 240

Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
245 250

<210> 41

<211> 252

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 41

Phe Glu Phe Ser Tyr Ser Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr
 1 5 10 15

Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln
 20 25 30

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ala Arg Thr Gln Ser Asn Pro Gly Gly Thr Ala
 35 40 45

Gly Asn Arg Glu Leu Gln Phe Tyr Gln Gly Gly Pro Ser Thr Met Ala
 50 55 60

Glu Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Phe Arg Gln Gln Arg
 65 70 75 80

Val Ser Lys Thr Leu Asp Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr
 85 90 95

Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Val Asn Pro
 100 105 110

Gly Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Asp Arg Phe Phe Pro
 115 120 125

Ser Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys Thr Gly Ala Thr Asn Lys Thr
 130 135 140

Thr Leu Glu Asn Val Leu Met Thr Asn Glu Glu Glu Ile Arg Pro Thr
 145 150 155 160

Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ser Ser Asn Leu Gln
 165 170 175

Ala Ala Asn Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Thr Ala Ala
 180 185 190

Gln Thr Gln Val Val Asn Asn Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp
 195 200 205

Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro
 210 215 220

His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly
 225 230 235 240

Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn
 245 250

<210> 42
<211> 249
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> Polipéptido sintético

10 <400> 42

Phe Gln Phe Ser Tyr Glu Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr
1 5 10 15

ES 2 638 342 T3

Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln
20 25 30

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln
35 40 45

Gln Thr Leu Lys Phe Ser Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln
50 55 60

Gly Arg Asn Tyr Ile Pro Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser
65 70 75 80

Thr Thr Val Thr Gln Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala
85 90 95

Ser Ser Trp Ala Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro
100 105 110

Ala Met Ala Ser His Lys Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser
115 120 125

Gly Ser Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp
130 135 140

Ala Asp Lys Val Met Ile Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn
145 150 155 160

Pro Val Ala Thr Glu Ser Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser
165 170 175

Ala Gln Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Gln Ala Gln Thr
180 185 190

Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
195 200 205

Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr
210 215 220

Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys
225 230 235 240

His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
245

<210> 43

<211> 248

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5

<400> 43

ES 2 638 342 T3

Gln Phe Ser Tyr Glu Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala
1 5 10 15

His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr
20 25 30

Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln
35 40 45

Thr Leu Lys Phe Ser Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly
50 55 60

Arg Asn Tyr Ile Pro Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr
65 70 75 80

Thr Val Thr Gln Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser
85 90 95

Ser Trp Ala Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala
100 105 110

Met Ala Ser His Lys Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly
115 120 125

Ser Leu Ile Phe Gly Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala
130 135 140

Asp Lys Val Met Ile Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro
145 150 155 160

Val Ala Thr Glu Ser Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Gly
165 170 175

Gln Ala Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Gln Ala Ala Thr Gly
180 185 190

Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg
195 200 205

Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp
210 215 220

Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His
225 230 235 240

Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys
245

<210> 44
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Péptido sintético

10 <400> 44

Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser
 1 5 10 15

Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp
 20 25 30

Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln
 35 40 45

Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp
 50 55 60

Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly
 65 70 75 80

Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
 85 90 95

Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
 100 105 110

Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
 115 120 125

Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
 130 135 140

Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
 145 150 155 160

Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Leu
 165 170 175

ES 2 638 342 T3

Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ala Thr
180 185 190

Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro Gly Ser Val Trp Met Glu
195 200 205

Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro Glu Thr
210 215 220

Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys
225 230 235 240

His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn
245 250

<210> 45

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10 <400> 45

Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala
1 5 10

15 <210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 46

Leu Ala Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro Ala
1 5 10

25

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

35 <400> 47

Leu Ala Lys Ala Gly Gln Ala Asn Asn Ala
1 5 10

40 <210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

5 <400> 48

Leu Ala Lys Asp Pro Lys Thr Thr Asn Ala
 1 5 10

10 <210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido sintético

20 <400> 49

Ala Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala
 1 5 10

25 <210> 50

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 50

Ala Ala Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro Ala
 1 5 10

35 <210> 51

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

40 <400> 51

Ala Ala Lys Ala Gly Gln Ala Asn Asn Ala
 1 5 10

45 <210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 52

Ala Ala Lys Asp Pro Lys Thr Thr Asn Ala
 1 5 10

55 <210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

5 <400> 53

Gly Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala
 1 5

10 <210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 54

Gly Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro Ala
 1 5

20 <210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Polipéptido sintético

25 <400> 55

Gly Lys Ala Gly Gln Ala Asn Asn Ala
 1 5

30 <210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Péptido sintético

40 <400> 56

Gly Lys Asp Pro Lys Thr Thr Asn Ala
 1 5

45 <210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>

<223> Polipéptido sintético

50 <400> 57

Lys Asp Thr Asp Thr Thr Arg
 1 5

55 <210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

5 <400> 58

Arg Ala Gly Gly Ser Val Gly
 1 5

10 <210> 59
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido sintético

15 <400> 5

Ala Val Asp Thr Thr Lys Phe
 1 5

20 <210> 60
 <211> 7

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 60

Ser Thr Gly Lys Val Pro Asn
 1 5

30 <210> 61
 <211> 10

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido sintético

40 <400> 61

Leu Ala Lys Asp Thr Asp Thr Thr Arg Ala
 1 5 10

45 <210> 62

<211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 62

Leu Ala Arg Ala Gly Gly Ser Val Gly Ala
 1 5 10

55 <210> 63

<211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 638 342 T3

<220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 63

5

Leu Ala Ala Val Asp Thr Thr Lys Phe Ala
1 5 10

<210> 64

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15

<400> 64

Leu Ala Ser Thr Gly Lys Val Pro Asn Ala
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr), o una composición farmacéutica que comprende dicho virión, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad ocular en un individuo que lo necesite, en donde la composición comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y en donde el virión del virus adenoasociado recombinante (VAAr) comprende:
- 5 a) una proteína de la cápside de VAA variante, en donde la proteína de la cápside de VAA variante comprende una inserción de un péptido en el bucle GH de la proteína de la cápside en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, en donde la inserción comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de LGETTRP (SEQ ID NO:13), NETITRP (SEQ ID NO:14), KAGQANN (SEQ ID NO:15), KDPKTTN (SEQ ID NO:16), KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59) y STGKVPN (SEQ ID NO:60); y
- 10 b) un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico;
- 15 en donde la proteína de la cápside variante infecta una célula retiniana.
2. El virión de VAAr o la composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde el sitio de inserción está dentro de los aminoácidos 570 a 611 de la proteína de la cápside de VAA2 expuesta en SEQ ID NO:1, o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de VAA.
- 20
3. El virión de VAAr o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la célula retiniana es un fotorreceptor, una célula ganglionar de la retina, una célula de Müller, una célula bipolar, una célula amacrina, una célula horizontal o una célula de epitelio pigmentario de la retina
- 25
4. El virión de VAAr o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho tratamiento es por inyección intraocular.
- 30
5. El virión de VAAr o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho tratamiento es por inyección intravítreo.
- 35
6. El virión de VAAr o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la enfermedad ocular es glaucoma, retinitis pigmentosa, degeneración macular, retinosquisis, amaurosis congénita de Leber, retinopatía diabética, acromatopsia o daltonismo.
7. Un virión de virus adenoasociado recombinante (VAAr) que comprende:
- 40 a) una proteína de la cápside de VAA variante, en donde la proteína de la cápside de VAA variante comprende una inserción de un péptido en el bucle GH de la proteína de la cápside en relación con una correspondiente proteína de la cápside de VAA parental, en donde la inserción comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de LGETTRP (SEQ ID NO:13), NETITRP (SEQ ID NO:14), KAGQANN (SEQ ID NO:15), KDPKTTN (SEQ ID NO:16), KDTDTTR (SEQ ID NO:57), RAGGSVG (SEQ ID NO:58), AVDTTKF (SEQ ID NO:59) y STGKVPN (SEQ ID NO:60), y en donde la proteína de la cápside variante confiere infectividad de una célula retiniana; y
- 45 b) un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico.
8. El virión de VAAr de la reivindicación 7, en el que el sitio de inserción está dentro de los aminoácidos 570 a 611 del conjunto de proteína de la cápside de VAA2 expuesto en SEQ ID NO:1, o la correspondiente posición en la proteína de la cápside de otro serotipo de VAA.
- 50
9. El virión de VAAr de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, en donde la célula retiniana es un fotorreceptor, una célula ganglionar de la retina, una célula de Müller, una célula bipolar, una célula amacrina, una célula horizontal o una célula del epitelio pigmentario de la retina.
- 55
10. El virión de VAAr de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en donde el producto génico es un ARN interferente, un aptámero o un polipéptido.
- 60
11. El virión de VAAr de la reivindicación 10, en el que el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en: factor neurotrófico derivado de la glía, factor 2 de crecimiento de fibroblastos, neuritina, factor neurotrófico ciliar, factor de crecimiento del nervio, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor de crecimiento epidérmico, rodopsina, inhibidor ligado a X de apoptosis, retinosquisina, EPR65, proteína 1 que interactúa con GTPasa de retinitis pigmentosa, periferina, periferina 2, una rodopsina y Sonic hedgehog.

12. Una composición farmacéutica que comprende:

- a) un virión de virus adenoasociado recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11; y
- b) un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5

13. Un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la cápside de virus adenoasociado (VAA) variante, en donde la proteína de la cápside de VAA variante es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11.

10 14. Una célula hospedadora genéticamente modificada aislada que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 13.

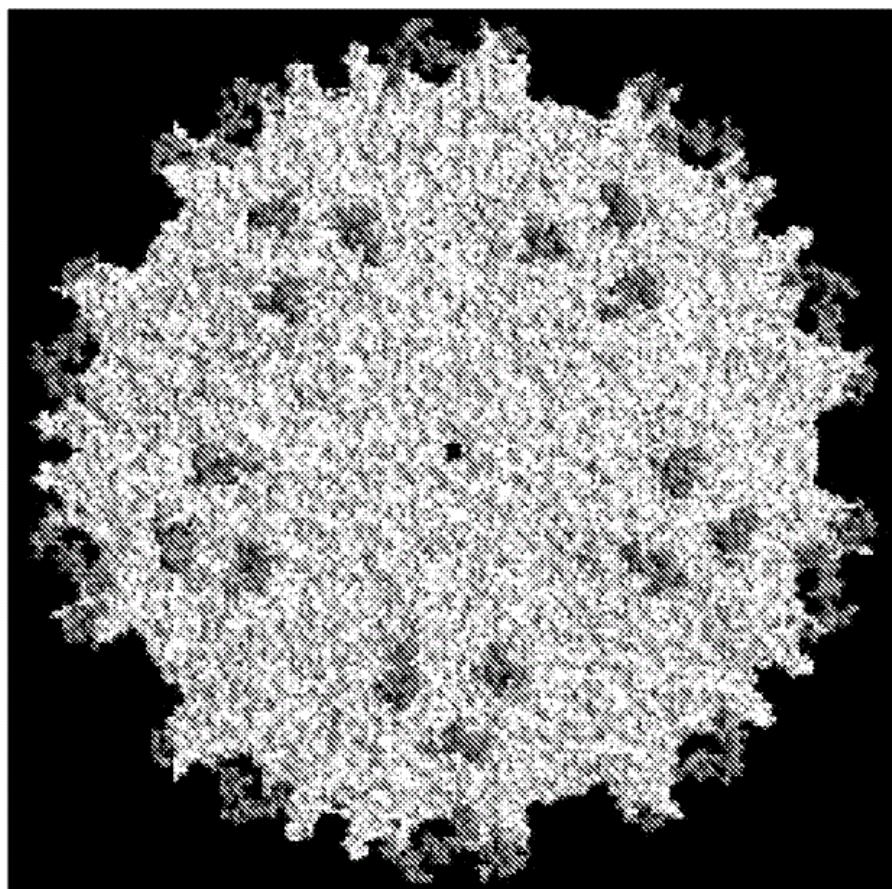
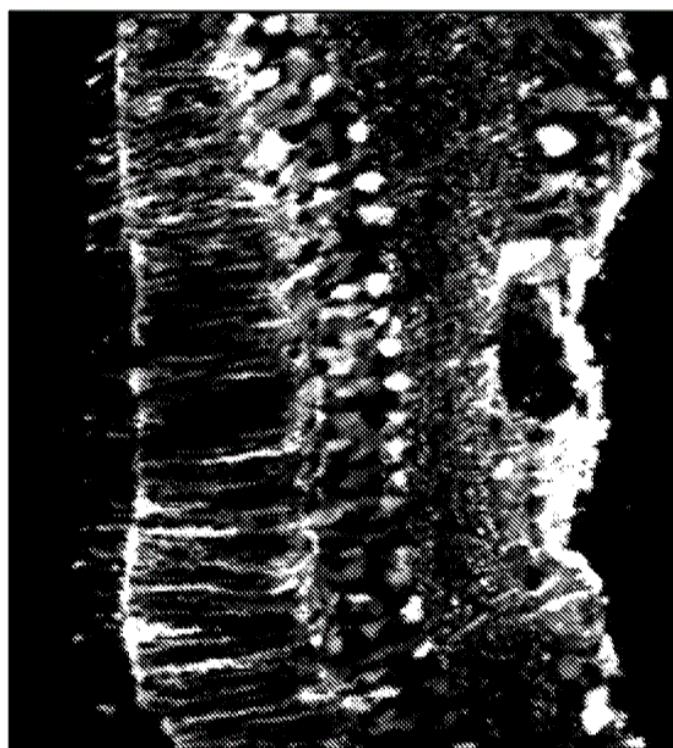
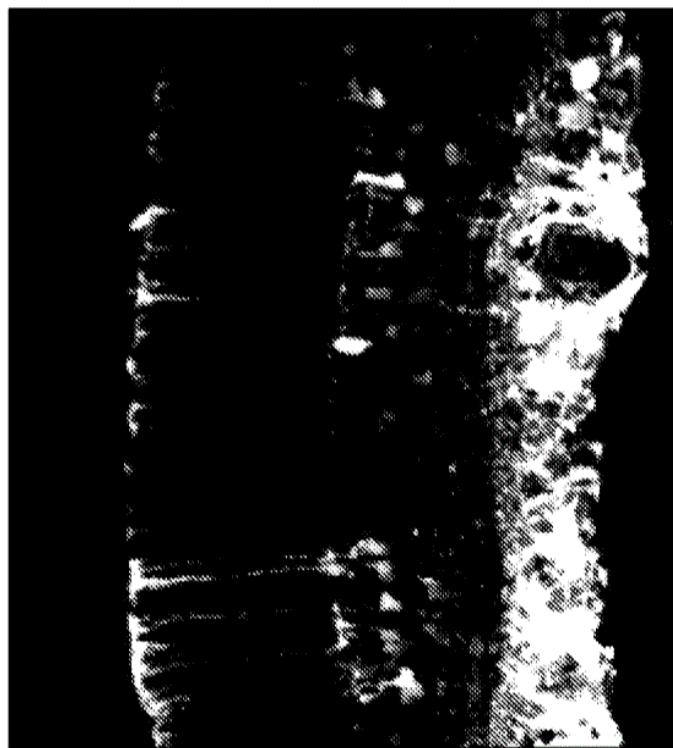


FIG. 1



VAA2.CAG.GFP
(serotipo parental)



7m8.CAG.GFP
(variante aumentada para transducción
de FR por evolución dirigida)

FIG. 2

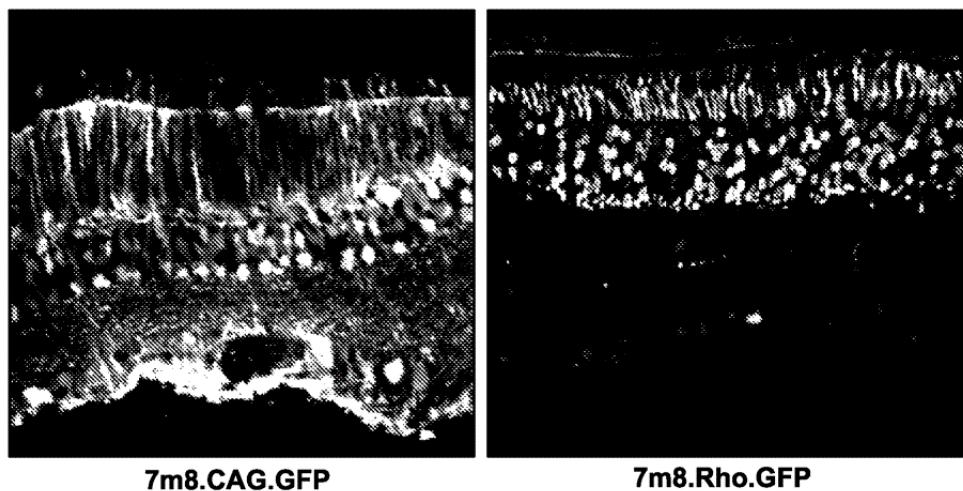


FIG. 3

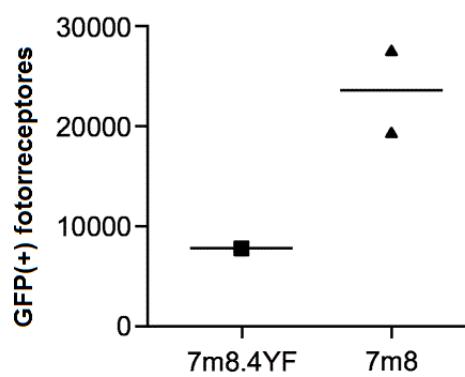


FIG. 4

VA2 VP1	1	MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPENGLD
VA2 VP1	61	KGEPVNEDAALAEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERIILEDTSFGGNLGRAVFAQ
VA2 VP1	121	AKKRVLEPLGLVVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGAQQPARKRINFGQTGDAD
VA2 VP1	181	SVDPDQPLGQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVI
VA2 VP1	241	TTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLI
VA2 VP1	301	NNWQFRPKRINFKLNFNIVQKEVTQNDGTTIANNLTTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
VA2 VP1	361	CLPPFPADVFMVPOQYGLTINNGSQAVGRSSFYCYLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPF
VA2 VP1	421	HSSYAHQSSSLDRLMNPLIDQYLYYLRSRTNTPSGTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPG
VA2 VP1	481	PCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFPPQSGVL
VA2 VP1	541	IFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQORG <u>NRQAA</u> ATADVNTQGV
VA2 VP1	601	LPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFPSPLMGGFGLKHPPQILIRNTPV PANPSTT
VA2 VP1	661	FSAAKFASFITQYSTGQSVETIWELOKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVY
VA2 VP1	721	SEPRPIGTRYLTR (SEQ ID NO:1)

FIG. 5

VAA- 2	570	PVATEQYGSVSTNL <u>QRGNR</u> QAATADVN <u>TQGVL</u> PGMVWQDRDV	611	(SEQ ID NO:2)
VAA-1	571	PVATERFGTVAVNFQSSST <u>DP</u> ATGDVHAMGALPGMVWQDRDV	612	(SEQ ID NO:3)
VAA- 5	560	RVAYNVGGQMATNN <u>QSS</u> TTAPATGTYNLQEIVPGSVWMERDV	601	(SEQ ID NO:4)
VAA- 6	571	PVATERFGTVAVNLQSSST <u>DP</u> ATGDVHVMGALPGMVWQDRDV	612	(SEQ ID NO:5)
VAA- 7	572	PVATEEYGIVSSNL <u>QAANT</u> AAQTQVNNQGALPGMVWQNRDV	613	(SEQ ID NO:6)
VAA- 8	573	PVATEEYGIVADNL <u>QQONT</u> APQIGTVNSQGALPGMVWQNRDV	614	(SEQ ID NO:7)
VAA- 9	571	PVATESYGVATNHQSA <u>QA</u> QATGWWQNQGILPGMVWQDRDV	612	(SEQ ID NO:8)
VAA-10	573	PVATEQYGVVADNL <u>QQA</u> NTGGPIVGNVNSQGALPGMVWQNRDV	614	(SEQ ID NO:9)

FIG. 6

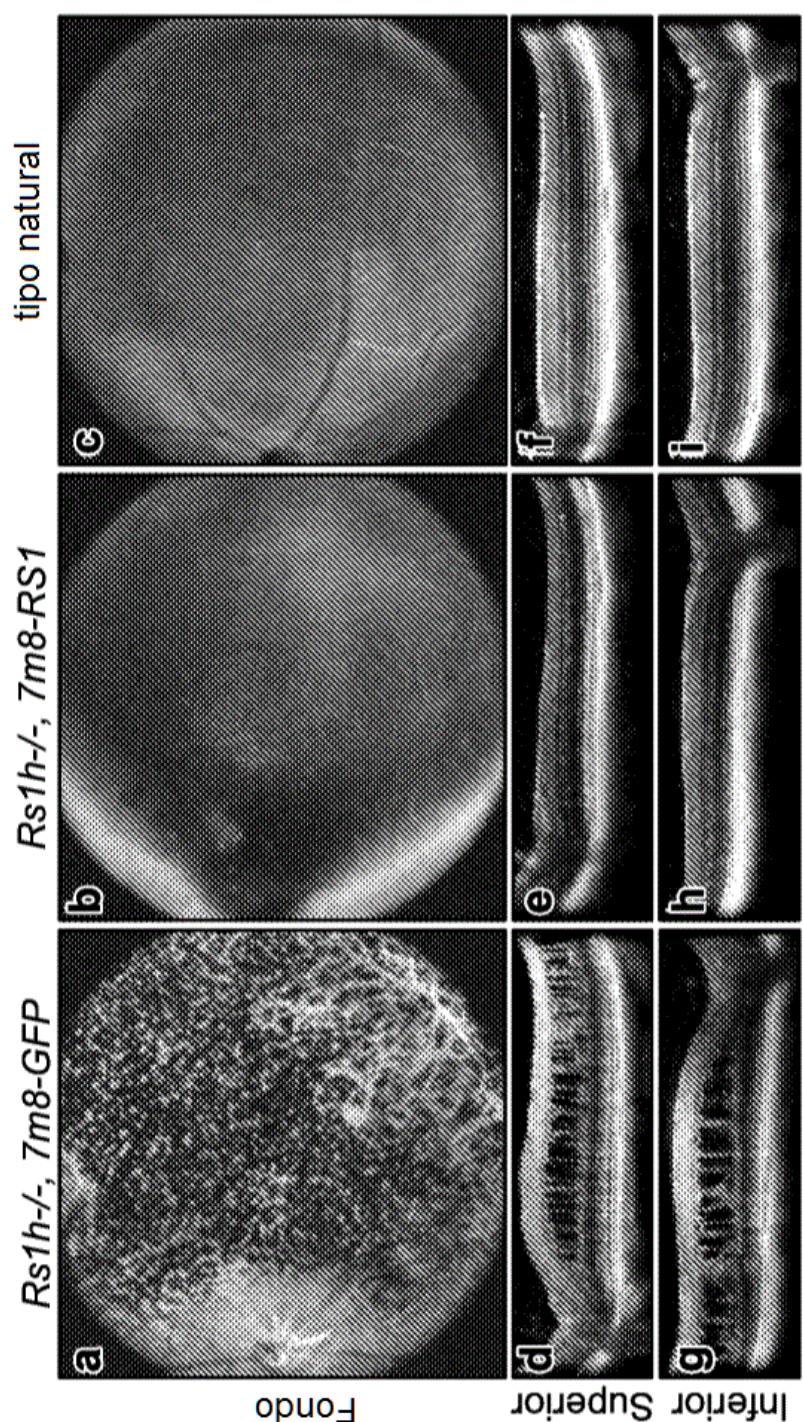
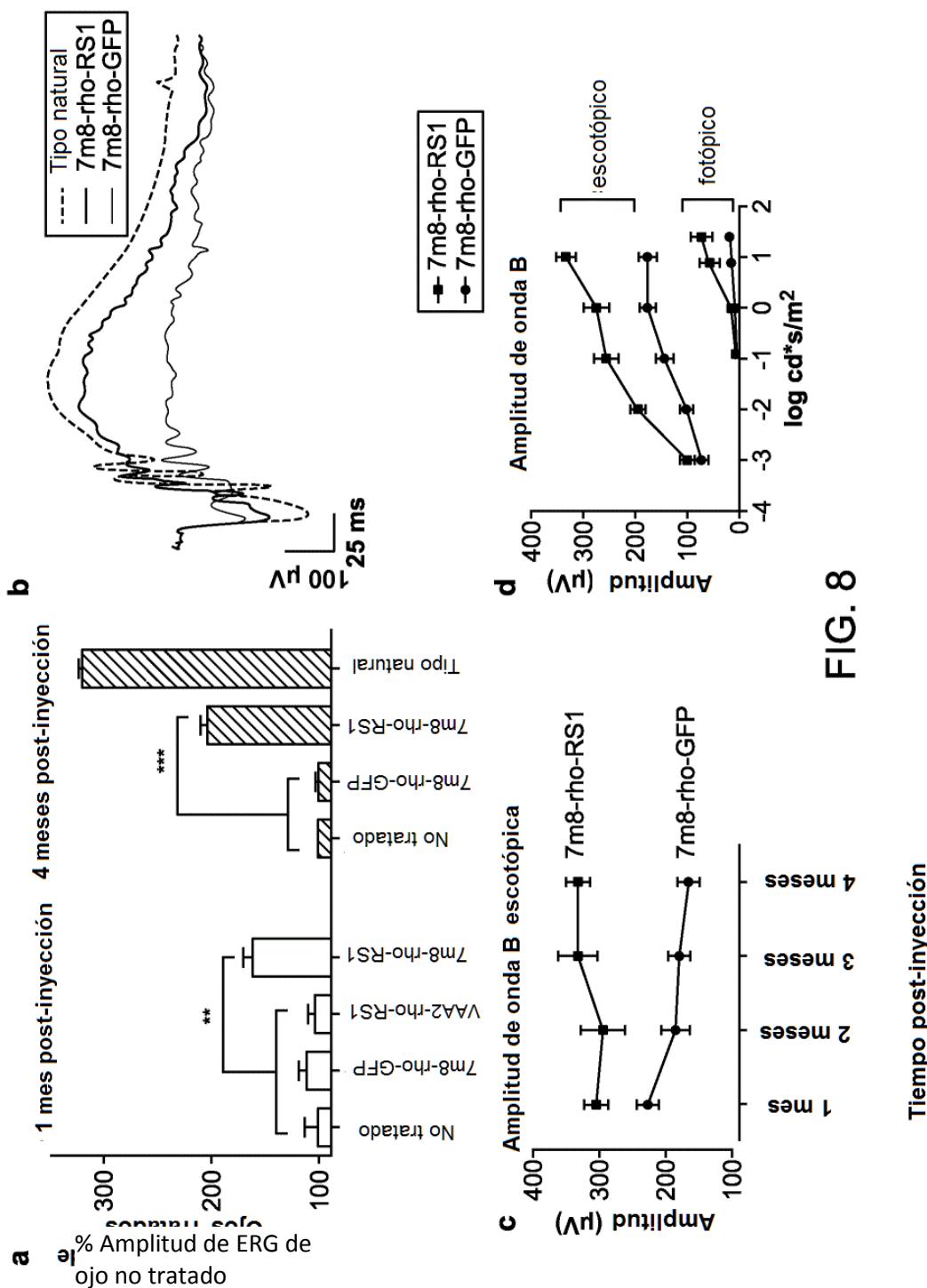


FIG. 7



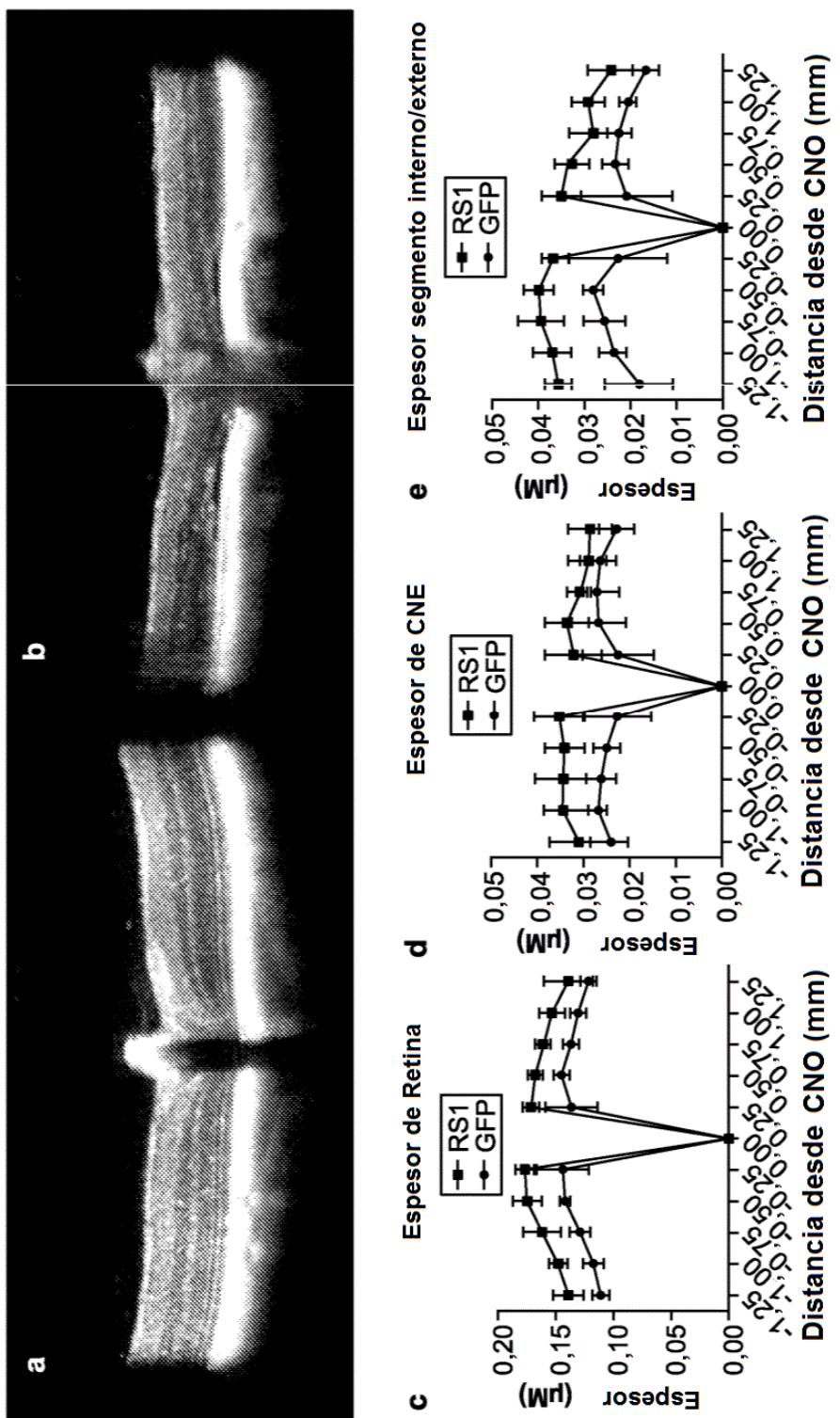


FIG. 9

Retinosquisina-1
Homo sapiens
GenBank CAA142483

1 msrkriegfl1 111fgyeat1 gisstege
61 pecpyhkplg fesgevtpdq itcsnpeqyy
121 qwlqidkei kvisgiltqg rcdidewmtk
181 drtstvqn11 rppiisrfir liplqwhvri
airmellecv skca (SEQ ID NO:10)

FIG. 10

Factor neurotrófico derivado de cerebro
Homo sapiens
GenBank CAA62632

1 mtillfltmvi syfgcmkaap mkeanirggq glaypqrth gtllesvngpk agsrgltsla
61 dtfehvieel 1dedhkvrpn eenkdadly tsrvmlssqv pleppllfil eeyknyldaa
121 nmsmmv1rhs dparrgelsv cdsisewvta adkktavdms ggtvtvleky pvskgqlkqy
181 fyetkcnpmg ytkegcrqid krhwnsqcrt tqsyvraltm dskkrigwrf iridtscvct
241 1tikrgr (SEQ ID NO:11)

FIG. 11

EPR65
Homo sapiens
 GenBank AAC39660

1 msiqvehpag gykklfetve elsspltahv tgriplwlq sllrcpglf evgsepfyhl
 61 fdgqallhkf dfkeghvtyh rrfirtdayv ramtekrii tefgtcafpo pcknifsrff
 121 syfrqvevtd nalvnvypvg edyyacten fitkinpetl etikqvdlcn yvsvngatah
 181 phiendgtvy nigncfgknf siaynivkip plqadkedpi skseivvqfp csdrfkpsyy
 241 hsfgltptnyi vfvetpvkin lfkflsswsl wganymdcfe snetmgvwlh iadkkkrky1
 301 nnkyrtspfn lfhhintyed ngflivlcc wkgfefvny lyilanrenw eevkknarka
 361 pqpevrryv1 plnidkadtg knlvtpnntt atailcsdet iwlpeplfs gprqafefpq
 421 inyqkycgkp ytyayglqln hfvpdrlck1 nvktketwwq qepdsyppsep ifvshpdale
 481 eddgvv1svv vspgaggqkpa ylllnakdl sevaraeevi niptfhglf kks (SEQ ID NO:12)

FIG. 12

1 agcttggatc caatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact ggttattctta
 61 actatgttgc tccttttacg ctatgtggat acgtccctttt aatcatgtcta
 121 ttgcctcccg tatggcttcc attttctccct ctttgcgttgc ctgtctcttt
 181 attagggatt gtggcccggt gtcaggcaac gtggcgtggt ttgtgtgacg
 241 caacccac tggttgggc attggccacca cctgtcagct cttttccggg actttcgctt
 301 tccccctccc tattggccacg gcggaactca tcgcccctg ctttgcggc tgctggacag
 361 ggctcggtt gttggggact gacaatttccg tggtgttgc acgtcccttc
 421 catggctgtt cggctgttt gccacctggta ttctgcgcgg gacgtccctc tgctacgtttc
 481 cttcggccctt caatccaggcg gaccttccctt cccggggctt gttggggctt ctgcggccctc
 541 ttcccggtct tcgagatctg cctcgactgt gccttcttagt tgccaggccat ctgttgttgc
 601 cccctcccc gttcccttcc ttgccccttcc aggtgccact ccactgttcc ttccctaata
 661 aaatggggaa attggcatgc attggcatgc attgtctgag tagtgtcat tctattctgg ggggtgggg
 721 gggccaggac agcaaggggg aggattggga agacaatacg aggcatgtcg gggactcgag
 781 ttaaggccga attcccgatt aggtatctcc tagagcatgg ctacgttagat aagttagcatg
 841 gggggtaat cattaaatc aggaaacccc tagtgatggaa gttggccact ccctctctgc
 901 gcgcgcgtc gctcaactgag gccaaggccgac caaaggccgcg ccgacgcccc ggctttggcc
 961 gggccgcctc agtgaggcgag cgaggcgca gccttaattt acctaatttca ctggccgtcg
 1021 ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcgc ctgcagcac
 1081 atccccctt cggccaggctgg cgttaatagg aagaggcccc caccgatcgcc cttttccaaac
 1141 agttgcgcag cctgaatggc gaatgggacg cgccccctgg cggcgccattha agcggggg
 1201 gtgtgtgtt tacgcgcagc gtgaccgcata cacttgcag cgccttagcg cccgctccct
 1261 tcgtttttt cccttccctt ctcggccacgt tcgccccctt tccccgtcaa gctctaatac
 1321 gggggctccc tttagggttc cgatttagg ctttacggca cctcgcacccc aaaaaacttg
 1381 attagggtga tggttcacgt agtggggccat cgcccccata gacgggtttt cggcccttga
 1441 cgctggagtt cacgttccctt aatagtggac ttttgttcca aactggaaaca aactcaacc
 1501 ctatctcggtt ctattctttt gattataag ggattttcc gatttggcc tatttgtttaaa
 1561 aaaaatggact gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa caaaatattttaa agtttataaa
 1621 tttcagggtgg catctttcgg gggaaatgtgc gcggaaaccc tatttgttta tttttcttaaa
 1681 tacattcaaa tatgttatccg ctcatgagac aataaacccctg ataaaatgctt caataatattt
 1741 gaaaaaggaa gagtagatgagt attcaacat tccgtgtcgcc ctttttttttgggg
 1801 cattttggctt tcctgtttt gctcacccag aaacgctggt gaaaggaaaaa gatgtgtgaaag

FIG. 13A

1861	atcaggttgg	tgcacgagtg	ggttacatcg	aactggatc	caatagtggt	aagatcccttg
1921	agagtttcg	ccccgaagaa	cgtttccaa	tgtatggac	tttttaaagt	ctgctatgt
1981	gcgcggtatt	atcccgatt	gacggccggc	aagagcaact	cggtcgccc	atacactatt
2041	ctcagaatga	cttgggttag	tactaccag	tcacagaaaa	gcattttacg	gatggcatga
2101	cagtaagaga	attatgcgt	gctgccat�	ccatgagtga	taacactgac	gccaacttac
2161	ttctgacaac	gatcgaggg	cgaaaggaggc	taaccggctt	tttgacaaac	atggggatc
2221	atgtaactcg	ccttgatcgt	tggaacccgg	agctgaatqa	agccatacca	aacgacgagc
2281	gtgacaccac	gatgcctgt	gtaatggtaa	caacgttgcg	caaactatta	actggcgaac
2341	tacttactt	agcttcccg	caacaattaa	tagactggat	ggaggccgat	aaagtgtcag
2401	gaccactct	gcgctcgccc	ttcccggtg	gctgggtttat	tgctgataaa	tctggagccg
2461	gtgagcggt	gtctcggt	atcattgcag	cactggggc	agatggtaaag	ccctcccgta
2521	tcgttagttat	ctacacgacg	gggagtcagg	caactatgg	tgaacgaaat	agacagatcg
2581	ctgagatagg	tgccctcactg	attaaggatt	ggttaactgtc	agaccaagt	tactcatata
2641	tacttagat	tgatttaaaa	tttcattttt	aattttaaaag	gatcttaggt	aagatccctt
2701	ttgataatct	catgacaaaa	atcccttaac	gtgagtttc	gttccactga	gcgtcagacc
2761	ccgttagaaaa	gatcaaagga	tcttctttag	atccttttt	tctggcgta	atctgtct
2821	tgcaaaaaaa	aaaaccacgg	ctaccaggcg	tgggttgg	gccggatcaa	gagctaccaa
2881	ctcttttcc	gaaggttaact	ggcttcagca	gagcgcagat	accaaataact	gtccttctag
2941	tgttagccgt	gttagggccac	cacttcaaga	actctgttagc	accggctaca	tacctcgctc
3001	tgctaattcct	gttaccatgt	gctgctggca	gtggcgataa	gtcgtgtt	accgggttgg
3061	actcaagacg	atagttacgg	gataaggcgc	agcggtcggg	gtgaacgggg	ggttcgtgca
3121	cacagccag	cttggagcga	acgaccta	ccggacttac	cgtgagctat	cgtgagctat
3181	gagaaaagcgc	cacgctccc	gaagggagaa	aggcggacag	gtatccggta	agcggcagggg
3241	tcggaaacagg	agagcgcacg	agggagctc	caggggaaa	cgcctggat	ttttagatgc
3301	ctgtcggtt	tgcccaacctc	tgacttgagg	gtcgatttt	gtgatgtcg	tcagggggcc
3361	ggagccctatg	gaaaaacgcc	agcaacgg	cctttttag	gttcctggcc	ttttgtcg
3421	gttttgctca	catgttctt	cctgcgtt	cccctgattc	tgtggataac	cgtattaccg
3481	cctttttagtg	agctgatacc	gctcgccgca	gcccgaacgc	cgagcgcagc	gagtcaagtga
3541	gcgagggaa	ggaagaggcgc	ccaatacgca	aaccggctct	cccccgcgt	tggccgatcc
3601	attaatgcag	ctggcacgac	aggtttcccg	actggaaaqc	ggcaagtgag	cgcacgcaa
3661	ttaatgtgag	ttagctca	cattaggcac	cccaggctt	acactttatg	cttccggctc

FIG. 13B

3721 gtagttgtg tggaatttgt agcgataac aatttcacac agaaacagc tatgaccatg
 3781 attacccag attaaattaa ggctgcgc tcgcgcgtc actgcgcgc
 3841 gcccggcgt cggcgaccc ttggcgccc ggcctcgcc ggcctcgcc
 3901 gggagtggcc aactccatca ctgggggtc ctgggggtc atggatgtta atgataacc
 3961 cttatctac tagccatgtct ctagggat cggaaatgt cggaaatgt cttaaatgc
 4021 **ccacccatgc** **cacctggcaa** **actgtccctt** **ctctcaagg** **cccaaacatg** **gcctcccaaga**
 4081 **ctgcaacccc** **caggcagtca** **ggccctgttct** **ccacaaccc** **acagcacc** **tggacggaaat**
 4141 **ctgcttcttc** **ccacatttg** **gttccctccca** **gcccctgagc** **tcctctggc** **agggctgttt**
 4201 **ctttccatct** **ttgttatccc** **agggccctgc** **aaataatgt** **ttaatgaacg** **aacaagagaa**
 4261 **tgaattccaa** **ttcccatgca** **caaggatgg** **gcttcctggc** **ccttaggc** **ctgtctggca**
 4321 **ccagaaacgg** **aagctgca** **ttggcaggccc** **tgccctcatg** **gagctccccc** **tgtcagaggaa**
 4381 **gtgtggac** **tggatgtactc** **cagaggtaac** **ttgtgggaa** **acgaaacagg** **aaggggctgt**
 4441 **gtgacggat** **gagagactgg** **gagaataaac** **cagaaaatgt** **ctagctgtcc** **agaggacata**
 4501 **gcacagggc** **ccatggtccc** **tatttcaaac** **ccaggccacc** **agacttagct** **ggaccccttgg**
 4561 **gacagacaag** **tcatgtcagaa** **gttagggac** **cttctccccc** **ctttttctgg** **atggatctgt**
 4621 **agtaccttct** **cctccctgac** **ctcaggcttc** **ctcttagtgt** **accctggcc** **cctcttagaa**
 4681 **gccaatttagg** **ccctcaggttt** **ctgcagcggg** **gatataatgt** **attatgaaca** **cccccaatct**
 4741 **cccaatgtct** **gatccagccca** **ggagcttagg** **agggggagg** **cacttataa** **gggtctgggg**
 4801 **gggtcagaac** **ccagatgtc** **cccccgttca** **ctgtcagatatt** **ccatcacact** **qgcggcccg**
 4861 **ccaccatgtc** **acgcaagata** **gaagggtttt** **tgttattact** **tctctttggc** **tatgaaggcca**
 4921 **cattggatt** **atcgcttacc** **gaggatgaaag** **gcgaggaccc** **ctggtaacaa** **aaagcatgca**
 4981 **agtgcgattt** **ccaaaggagga** **ccaaatgtc** **tgtgggtctgc** **agggtccacc** **tccttggact**
 5041 **gtataccaga** **atgcccataat** **cacaaggcc** **tgggtttcga** **gtcaggggag** **gtcacacccgg**
 5101 **accagatcac** **ctgctctaacc** **cggaggcgt** **atgtgggctg** **gtattttctcg** **tggactgca**
 5161 **acaaggcccg** **gctcaaacatg** **caaggctt** **ggtgtccctg** **gctctccaa** **ttccaggaca**
 5221 **gtggccatgt** **gttacagata** **gatctgaagg** **agatcaaaatgt** **gatttcagg** **atcctccccc**
 5281 **agggggcgctg** **tgacatcgat** **gatgtggatga** **ccaaatgtac** **cgtgcgtac** **aggaccgtatg**
 5341 **aggccctgaa** **ctggattttac** **tacaaggacc** **agactggaaa** **caacccgggtc** **ttctatggca**
 5401 **actcgacc** **cacccac** **gttcagaacc** **tgctggggcc** **ccccatcatc** **tcccgtctca**
 5461 **tccgcctcat** **cccgcgtggc** **tggcacgtcc** **gcattggccat** **cgggatggag** **ctgctggagg**
 5521 **gcgtcagaac** **gtgtgcctgt** **ga** (SEQ ID NO:18)

FIG. 13C

Periferina-2

1 mallkvkfdq kkrvklaqgl wlmnwfsvla giifslglf lkielrksd vmnneshfv
 61 pnsligmgvl scvfnslagk icydaldpак yarwkpwlkp ylaicvlfn iiflvalccf
 121 llrgslel1 gqglkngmky yrdtdtpgrc fmkktdmlq iefkccgnng frdwfeiqwi
 181 snry1dfssk evkdriksnv dgry1vdgvp fsccnppsspr pciqyqitnn sahysydhqt
 241 eelnlwvrgc raallsyss lmnsmgvvt1 liwlfevtit iglrylqts1 dgvsnpeese
 301 sesqgwller svpetwkaf1 esvkk1gkgn qveaegadag qapeag (SEQ ID NO:19)

FIG. 14**Periferina**

1 mshhpsqlra gfsstsyrrt fgpppslsgp afsyssssrf ssssvrlgsf
 61 rspragal 1rlpsrldf smaealnqef latrsnekqe lqelndrfan fiekvrfleq
 121 qnaalrgels qargqepara dqlcqqlere lrrelellqr erdrvqverd glaedlaalk
 181 qrleetrkr edaehnlvlf rkdvddatls rlelerkies lmdeief1kk lheee1rd1q
 241 vsvesqqvqq vveatvkpe ltaalrdira qyesiaaknl qeaewyksk yadlssdaanr
 301 nhealrqakq emnesrrqiqsltcevdg1r gtneallrql releeqfale aggyqagaar
 361 leeelrg1ke emarhreyq ellnvkmald ieiatyrk1l egeesrisvp vhsfaslnik
 421 ttvpeveppq dshsrktvli ktietrngev vtesqkeqrs eldkssahsy (SEQ ID NO:20)

FIG. 15

Proteína 1 que interactúa con RGR

1 mshlvadptsg dlpvrididai plvlpaskgk nmktqpplsr mnreeledsf frlredhmlv
 61 kelswkqde ikrlrtllr ltaagrdlrv aeeaaplsr arrgkagwr qrlsmhqrpq
 121 mhrlqghfhc vgpasprraq prqvghrql htgapvpek pkrgprdrls ytapssfkeh
 181 atnenrgeva skpselvsgs nsisffsvi smakpiglcm pnsahimasn tmqveeppks
 241 pekmwpkden fegrsleca qkaaelrasi kekvelirlk kllhernas1 vmtkaqltev
 301 qeayet1lqk nqgilsaahe allkqvnelr aelkeeskka vslksqledv silqmtlkeh
 361 qervedleke rkllndnydk llesmldssd sssqphwsne liaeq1qqv sqlqdqldae
 421 ledkrkvle lsrekaqned lklevtn1q khkgevelliq naatisqppd rsepathpa
 481 v1qentqiep sepknqeeek lsvqlnelqv shaettle ktrdmnlqr kinvcyqee1
 541 eammtkadnd nrdhkekler ltr1ldlkn rikqlegilr shdlptseq1 kdvaygtrpl
 601 s1clet1pah qdedkvdis1 lhqgen1fel hinqafitsa alaqagdtqp ttfcrysfyd
 661 fethctpls vqpmplydfts qyvmetds1f lhy1qeasar ldihqamase hstlaagwic
 721 fdrvletvek vhglatliga ggeeffgvley wmr1rfpikp slqacnkrkk aqvylstdvl
 781 ggrkaqeeef rseswepqne lweitkccg lrsrwlgtqp spyavyrftt fsdhdtaiip
 841 asnnpyfrdq arfpvlvtsd ldy1rreal sihvfdde1 epgsy1grar vpl1plakne
 901 sikgdfnltd paekpangsiq vqldwkfpfyi ppesf1lkpea qtkgkdtkds skisseeeka
 961 sfpssqdqmas pevpiagqy rskrkpphgg erkekehqvv sysrrkhgkr igoqqgnrme
 1021 y1slnilngn tpeqvnnyew kfsetnsfig dgfkknqhee emtlshsalk qkeplhpvnd
 1081 kesseggsev seaqtdsdd vivpmpmsqky pkadsekmc1 eivslafype aevmsdenik
 1141 qvyveykfyd lplsetetpv slrkpragee ihfhfskv1d ldpqeqgrr rflfdm1ngq
 1201 dpdqgh1kft vvsdp1deek keceevgyay 1qlwqilesg rdileqeldi vspedlatpi
 1261 grlkvs1qaa avlhaiykmem ted1fs (SEQ ID NO:21)

FIG. 16

FIG. 17A

FIG. 17B

VAA 1	PQILIK-	650	(SEQ	ID	NO: 22)
VAA 6	PQILIK-	650	(SEQ	ID	NO: 23)
VAA 3	PQIMIK-	650	(SEQ	ID	NO: 24)
VAA 2	PQILIKN	650	(SEQ	ID	NO: 25)
VAA 8	PQILIKN	653	(SEQ	ID	NO: 26)
VAA 8 . 1	PQILIKN	653	(SEQ	ID	NO: 27)
VAA 8 rh8	PQILIKN	651	(SEQ	ID	NO: 28)
VAA 10	PQILIKN	653	(SEQ	ID	NO: 29)
VAA 7	PQILIKN	652	(SEQ	ID	NO: 30)
VAA 9	PQILIK-	650	(SEQ	ID	NO: 31)
VAA 9 . 1	PQILIK-	650	(SEQ	ID	NO: 32)
VAA 5	PMMLIKN	640	(SEQ	ID	NO: 33)
	*	:	:	*	*

FIG. 17C

VAA1	--TFSYTFEEVVFHSSYAHQSOLDRLMNPOLIDQYLYYLNRDQ-NQSGSAQNKDLLFSRGSS	467
VAA6	--TFSYTFEEVVFHSSYAHQSOLDRLMNPOLIDQYLYYLNRDQ-NQSGSAQNKDLLFSRGSS	467
VAA3	--FSYTFEDVVFHSSYAHQSOLDRLMNPOLIDQYLYYLNRDQ-TSGTTNQSRLLFSQAG	467
VAA2	--FSYTFEDVVFHSSYAHQSOLDRLMNPOLIDQYLYYLNRDQ-TSGTTTQSRLQFSQAG	466
VAA8	NEQFTYTFEDVVFHSSYAHQSOLDRLMNPOLIDQYLYYLNRDQ-TGTANTQTLGFSQGG	469
VAA8 . 1	NEQFTYTFEDVVFHSSYAHQSOLDRLMNPOLIDQYLYYLNRDQ-TGTANTQTLGFSQGG	469
VAA8 rh8	QFSYTFEDVVFHSSYAHQSOLDRLMNPOLIDQYLYYLNRDQ-TGTIGGTQTLAFSQAGPS	469
VAA10	NFEFSYTFEDVVFHSSYAHQSOLDRLMNPOLIDQYLYYLNRDQ-TGTIGGTQTLFSQAG	469
VAA7	-FEFSYTFEDVVFHSSYAHQSOLDRLMNPOLIDQYLYYLNRDQ-TGTIGGTQTLFSQAG	469
VAA9	-FQFSYEFENVVFHSSYAHQSOLDRLMNPOLIDQYLYYLNRDQ-TGTIGGTQTLKESVAG	467
VAA9 . 1	-FQFSYEFENVVFHSSYAHQSOLDRLMNPOLIDQYLYYLNRDQ-TGTIGGTQTLKESVAG	467
VAA5	NFEFTYTFEEVVFHSSFAPSQLFKLANPLVQDQYLYRFVSTN-----NTGGVQFNKNL	453
VAA1	PAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDDNNNSNFTWTGASKYNNLNGRESIINPGTAMASH	527
VAA6	PAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTDDNNNSNFTWTGASKYNNLNGRESIINPGTAMASH	527
VAA3	PQSMSLQARNWLPGPCYRQQRVSKTANDNNNSNFPWTAASKYHLLNGRDSLVNPGPAMASH	527
VAA2	ASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTISADNNNSSEYSWTGATKYHLLNGRDSLVNPGPAMASH	526
VAA8	PNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNNNNFAWTAGTKYHLLGRNSLANPGIAMATH	529
VAA8 . 1	PNTMANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNNNNFAWTAGTKYHLLGRNSLANPGIAMATH	529
VAA8 rh8	S--MANQARNWVPGPCYRQQRVSTTTGQNNNNNFAWTAGTKYHLLGRDSLVMNPGVAMASH	527
VAA10	PANMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTILSQNNNNNFAWTAGTKYHLLGRDSLVMNPGVAMATH	529
VAA7	PSTMMAEQAKNWLPGPCFCRQQRVSKTILDQNNNNNFAWTAGTKYHLLGRNSLVNPGVAMATH	529
VAA9	PSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASH	527
VAA9 . 1	PSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASH	527
VAA5	AGRYANTYKNWFPGPGRTOQGWNLGSVNRASVSAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTN	513

FIG. 18A

VAA 1						
VAA 6						
VAA 3						
VAA 2						
VAA 8						
VAA 8 . 1						
VAA 8	rh8					
VAA 10						
VAA 7						
VAA 9						
VAA 9 . 1						
VAA 5						

VAA 1						
VAA 6						
VAA 3						
VAA 2						
VAA 8						
VAA 8 . 1						
VAA 8	rh8					
VAA 10						
VAA 7						
VAA 9						
VAA 9 . 1						
VAA 5						

QSSSTD**DLALGETTRPAPATGDPVH**AMGALPGMVWQDRDVYLQGP*WAKI*PTDGHFHPSPLMGGFFGLKNPP
 QSSST**DLALGETTRPAPATGDPVH**YMGALPGMVWQDRDVYLQGP*WAKI*PTDGHFHPSPLMGGFFGLKHPP
 QSSNTAPTTGTVNHQGALPGMVWQDRDVYLQGP*WAKI*PTDGHFHPSPLMGGFFGLKHPP 644
QRLNLALGETTRPAPARQAATADVNTOGVLPGPMVWQDRDVYLQGP*WAKI*PTDGHFHPSPLMGGFFGLKHPP
QQLNLALGETTRPATAPOIGTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGP*WAKI*PTDGNFHPSPLMGGFFGLKHPP
QGQRGLGETTRPAQAAQIGTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGP*WAKI*PTDGNFHPSPLMGGFFGLKHPP
QAANLALGETTRPATAQATGLVHNQGVIPGMVWQNRDVYLQGP*WAKI*PTDGNFHPSPLMGGFFGLKHPP
QALALGETTRPAAQTQVNNNGQALPGMVWQNRDVYLQGP*WAKI*PTDGNFHPSPLMGGFFGLKHPP
QAANLALGETTRPATAAAQTQVNNNGQALPGMVWQNRDVYLQGP*WAKI*PTDGNFHPSPLMGGFFGLKHPP
QSAQLALGETTRPAQAAQTGWMQNGQILPGMVWQDRDVYLQGP*WAKI*PTDGNFHPSPLMGGFFGMKHPP
QSGQAALGETTRPAQAAQTGWMQNGQILPGMVWQDRDVYLQGP*WAKI*PTDGNFHPSPLMGGFFGMKHPP
QSLALGETTRPASTTAPATGTYNLQEVPGSVMMERDVYLQGP*WAKI*PTDGHFHPSPAMGGFFGLKHPP

FIG. 18B

VAA 1	PQILIK-	(SEQ	ID	NO: 34)
VAA 6	PQILIK-	(SEQ	ID	NO: 35)
VAA 3	PQIMIK-	(SEQ	ID	NO: 24)
VAA 2	PQILIKN	(SEQ	ID	NO: 36)
VAA 8	PQILIKN	(SEQ	ID	NO: 37)
VAA 8 .1	PQILIKN	(SEQ	ID	NO: 38)
VAA 8 rh8	PQILIKN	(SEQ	ID	NO: 39)
VAA10	PQILIKN	(SEQ	ID	NO: 40)
VAA 7	PQILIKN	(SEQ	ID	NO: 41)
VAA 9	PQILIK-	(SEQ	ID	NO: 42)
VAA 9 .1	PQILIK-	(SEQ	ID	NO: 43)
VAA 5	PMMLIKN	(SEQ	ID	NO: 44)

FIG. 18C

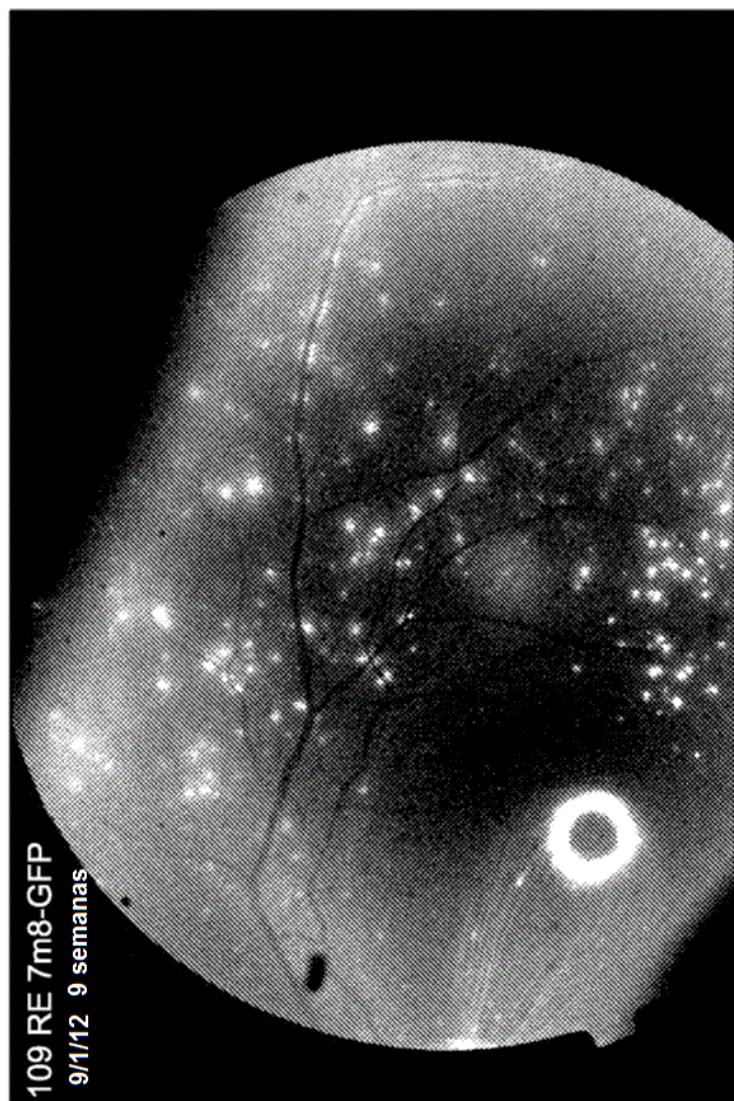


FIG. 19