

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 249**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7105** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/EP2014/054755**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14140051**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14709644 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2970972**

54 Título: **miR-204 y miR-211 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**11.03.2013 EP 13158603**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.01.2019**

73 Titular/es:

**FONDAZIONE TELETHON (100.0%)  
Via Varese 16B  
00185 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**SURACE, ENRICO MARIA;  
BANFI, SANDRO;  
CONTE, IVAN;  
KARALI, MARIANTHI y  
MARROCCO, ELENA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 697 249 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

miR-204 y miR-211 y usos de los mismos

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a al menos un agente capaz de aumentar el nivel de uno o más miARN en una célula o células de un sujeto, comprendiendo dicho miARN la secuencia UUCCUU, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una distrofia retiniana, en particular caracterizada por la degeneración de fotorreceptores, composiciones farmacéuticas relativas, ácidos nucleicos, vectores y células huésped.

**Antecedentes de la invención**

10 Los microARN (miARNs) son reguladores postranscripcionales de la expresión génica que se están convirtiendo en actores clave en el control de los procesos biológicos fundamentales tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La evidencia acumulada sugiere que los miARN pueden controlar vías funcionales específicas dirigiéndose a las redes de genes de genes funcionalmente correlacionados. En los seres humanos, la desregulación de la expresión de miARN causada por mutaciones en el miARN mismo o en su gen diana se ha correlacionado con una serie de afecciones patológicas como la diabetes, las enfermedades neurodegenerativas, insuficiencia cardíaca y sordera hereditaria (1, 2), entre otras. Recientemente, los miARN también están emergiendo como nuevas dianas de intervenciones terapéuticas para una variedad de enfermedades. Un papel terapéutico de los miARN ya se ha descrito en varios modelos de cáncer (3, 4), en enfermedades cardíacas (5, 6), en la distrofia muscular (7) y en los trastornos hepáticos (8, 9). El uso de un inhibidor de miR-122 ya ha entrado en los ensayos clínicos, encontrándose en los ensayos en fase I con el objetivo de tratar la infección por hepatitis C (10). Por lo tanto, el uso terapéutico de los miARN representa un campo de investigación prometedor en la medicina moderna, aunque su extensa aplicación requiere una comprensión adecuada de los cambios en la expresión génica controlados por los miARN.

25 La retina es una estructura en capas compuesta por seis tipos de células neuronales y una célula glial, que se organizan en tres capas celulares: la capa de células ganglionares, que comprende el ganglio retinal (RGC) y las células amacrinas desplazadas, la capa nuclear interna (INL), que contiene Interneuronas bipolares, horizontales y amacrinas y células gliales de Muller, y la capa nuclear externa (ONL), donde se ubican los fotorreceptores de bastón y cono. La retina está inmediatamente adyacente al epitelio pigmentario de la retina (RPE), una capa de células pigmentadas que nutre las células visuales de la retina, y que está firmemente unida a la coroides subyacente y a las células visuales de la retina suprayacentes (Figura 20).

30 Las distrofias retinianas hereditarias (IRDs) representan una de las causas más frecuentes de ceguera genética en el mundo occidental. La condición primaria que subyace a este grupo de enfermedades es la degeneración de los fotorreceptores, es decir, las células que convierten la información de la luz en señales químicas y eléctricas que luego se transmiten al cerebro a través de los circuitos visuales. Hay dos tipos de células fotorreceptoras en la retina humana: bastones y conos. Los bastones representan aproximadamente el 95% de las células fotorreceptoras en la retina humana y son responsables de detectar el contraste, el brillo y el movimiento, mientras que los conos perciben la resolución fina, la resolución espacial y la visión del color.

Los IRD se pueden subdividir en diferentes grupos de enfermedades, a saber, Retinitis Pigmentosa (RP), Amaurosis Congénita de Leber (LCA, por sus siglas en inglés), distrofias de bastones y conos y distrofias de conos.

40 La RP es la forma más frecuente de distrofia retiniana hereditaria con una frecuencia aproximada de aproximadamente 1 de cada 4.000 individuos (11). En su inicio clínico, la RP se caracteriza por la ceguera nocturna y la degeneración progresiva de fotorreceptores acompañados por depósitos pigmentarios similares a espículas óseas y un electroretinograma (ERG) reducido o ausente. La RP puede ser aislada o sindrómica, es decir, estar asociada a manifestaciones extraoculares como el síndrome de Usher o el síndrome de Bardet-Biedle. Desde un punto de vista genético, la RP es altamente heterogénea, con patrones de herencia autosómicos dominantes, autosómicos recesivos y ligados al X. Un porcentaje significativo de pacientes con RP, sin embargo, son aparentemente esporádicos. Hasta la fecha, se ha encontrado que alrededor de 50 genes/loci causales son responsables de formas no sindrómicas de RP y más de 25 para RP sindrómicas (sitio web de RETnet: <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>).

50 La LCA tiene una prevalencia de aproximadamente 2-3 en 100.000 individuos y se caracteriza por una discapacidad visual grave que comienza en los primeros meses/años de vida (12). La LCA tiene características retinianas, oculares y extraoculares y, ocasionalmente, asociaciones sistémicas. La LCA se hereda como un rasgo autosómico recesivo en la gran mayoría de los pacientes, mientras que la herencia autosómica dominante se ha descrito solo en un número limitado de casos. La LCA es genéticamente heterogénea y, hasta la fecha, se han identificado mutaciones en 15 genes diferentes: GUCY2D (nombre del locus: LCA1), RPE65 (LCA2), SPATA7 (LCA3), AIPL1 (LCA4), LCA5 (LCA5), RPGRIP1 (LCA6), CRX (LCA7), CRB1 (LCA8), CEP290 (LCA10), IMPDH1 (LCA11), RD3 (LCA12), NMNAT1 (LCA9), LRAT (LCA14), TULP1 (LCA15) y RDH12 (LCA13). El diagnóstico de LCA se establece por hallazgos clínicos. Las pruebas genéticas moleculares están disponibles clínicamente para los 15 genes que actualmente se sabe que están asociados con LCA. En conjunto, se estima que las mutaciones en estos genes

representan aproximadamente el 40%-50% de todos los casos de LCA, según la encuesta.

Las distrofias de conos y bastones (CRD) tienen una prevalencia de 1/40.000 individuos y se caracterizan por depósitos de pigmento retiniano visibles en el examen del fondo de ojo, predominantemente localizados en la región macular. En contraste con el RP típico, que se caracteriza por la pérdida primaria en fotorreceptores de bastones, seguido más tarde por la pérdida secundaria en fotorreceptores de cono, los CRD reflejan la secuencia opuesta de eventos. La CRD se caracteriza por una afectación primaria del cono o, a veces, por la pérdida concomitante de ambos conos y bastones, lo que explica los síntomas predominantes de la CRD: disminución de la agudeza visual, defectos de la visión del color, fotoaversión y menor sensibilidad en el campo visual central, seguido después de una pérdida progresiva de la visión periférica y ceguera nocturna (13). Las mutaciones en al menos 20 genes diferentes se han asociado con CRD (sitio web de RETnet: <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>).

Las distrofias de cono (CD) son condiciones en las que los fotorreceptores de cono muestran una disfunción selectiva que no se extiende a los bastones. Se caracterizan por un déficit visual, anomalías en la visión del color, pérdida del campo visual y un grado variable de nistagmo y fotofobia. En los CD, la función del cono está ausente o gravemente dañada en la electroretinografía (ERG) y en las pruebas psicofísicas (14). Al igual que las otras formas de distrofias retinianas hereditarias, las CD son afecciones heterogéneas que pueden estar causadas por mutaciones en al menos 10 genes diferentes (sitio web de RETnet: <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>).

Como también se mencionó anteriormente, los IRD se deben a la degeneración y posterior muerte de las células fotorreceptoras, principalmente bastones en el caso de RP y LCA y principalmente conos en el caso de CRD y CD. De interés, en RP y en la mayoría de las formas de LCA, la degeneración de los bastones es seguida por una degeneración secundaria de los conos. La gran mayoría de los genes responsables de los IRD se expresan predominantemente en fotorreceptores (bastones o conos). Algunos genes IRD se expresan predominantemente en el epitelio pigmentario de la retina. Sin embargo, también en este último caso, la principal consecuencia que se deriva de la disfunción de estos genes es un daño en la función del fotorreceptor, que luego se traduce en degeneración y muerte del fotorreceptor. Para la mayoría de las formas de las enfermedades mencionadas anteriormente, no hay disponible actualmente ninguna terapia efectiva.

Los autores están investigando actualmente el posible uso de miARN como herramientas terapéuticas en las distrofias retinianas hereditarias. Los autores han estudiado recientemente el patrón de expresión de los miARN durante las etapas principales del desarrollo del ojo de los mamíferos y han generado el atlas de expresión más completo y actualizado de los miARN en el ojo de los mamíferos (15, 16).

Como resultado, los autores identificaron un subconjunto de miARN que mostraban niveles significativos de expresión en el ojo de los mamíferos, y entre esos miR-204 y miR-211. Los autores iniciaron una caracterización funcional detallada de los últimos miARN, utilizando principalmente modelos in vivo. En particular, los autores demostraron anteriormente, mediante el uso de enfoques de ganancia y pérdida de función en el organismo modelo de peces medaka [*Oryzias latipes* (ol)], que la alteración de la actividad de miR-204 tiene un impacto significativo en los múltiples aspectos de la diferenciación y función ocular. En particular, la ablación mediada por morfolino de la expresión de miR-204 dio lugar a un fenotipo ocular caracterizado por microftalmía y un patrón dorsoventral alterado (D-V) de la retina, que causa coloboma óptico (17).

Curiosamente, miR-204 y miR-211 son parálogos estrechamente relacionados en mamíferos que comparten la misma secuencia de la región semilla y el mismo conjunto de objetivos predichos (TargetScan) (18). Solo difieren por un nucleótido en ratón y dos nucleótidos en el ser humano.

Recientemente, se ha sugerido que miR-204 y miR-211 ejercen un efecto protector tanto en la integridad del epitelio pigmentario de la retina (RPE) como una barrera y en la prevención de su proliferación anormal (23).

Sobre esa base, se ha propuesto que la liberación de estos dos miARN al RPE puede ejercer un papel beneficioso en las enfermedades oculares causadas por anomalías en la diferenciación y proliferación del RPE, incluida la retinopatía vítrea, la degeneración macular y la retinopatía diabética.

La solicitud WO2010027838 se refiere a métodos para prevenir o tratar la proliferación de células epiteliales retinales perjudiciales, la pérdida de la diferenciación de células epiteliales retinianas, la degeneración macular relacionada con la edad y/o la retinopatía vítrea proliferativa mediante la administración de miR-204, miR-211, o una mezcla de miR-204 y miR-211.

El documento WO2009137807 se refiere a métodos y composiciones para diagnosticar y/o tratar, entre otras, enfermedades vasculares del ojo, específicamente enfermedades neovasculares oculares o retinianas/coroideas, mediante la administración de un inhibidor de miR-211. Los métodos implican medir los niveles de uno o varios miARN en muestras de pacientes y usar los resultados de las pruebas para diagnosticar y/o predecir un régimen de tratamiento óptimo para el paciente. El uso de miR-211 se reivindica para aumentar la vascularización.

Maguire et al. (The lancet, 374 (9701):1597-1605, 2009) describe un virus adeno-asociado (AAV) que contiene un gen que codifica RPE65 para su uso en el tratamiento de la amaurosis congénita de Leber. Conte et al. (Resumen C056, 2012) describe que miR-204 y miR-211 desempeñan múltiples funciones en la retina.

Entonces, todavía existe la necesidad de una terapia que tenga un efecto protector sobre el proceso de degeneración y muerte de los fotorreceptores, que son las condiciones principales que subyacen a las distrofias retinianas hereditarias. En tales enfermedades, la diferenciación y proliferación de RPE anormales no desempeñan funciones patógenas clave.

5 **Resumen de la invención**

La presente invención se refiere al uso de miARN miR-204 y/o miR-211 para proteger la retina de la degeneración neuronal. Los autores de la presente invención encontraron que la administración intrarretinal de miR-204 y/o de miR-211, particularmente en células fotorreceptoras, ejerce un efecto beneficioso en la degeneración de los fotorreceptores, y particularmente en IRD, incluyendo retinitis pigmentosa (tanto formas aisladas como sindrómicas), amaurosis congénita de Leber, distrofias de conos y bastones y distrofias de conos. En particular, esto demuestra el efecto terapéutico obtenido por la administración de miARN individuales en fotorreceptores in vivo.

Los miARN son complementarios a una parte o fragmento de uno o más mRNA. Además, los miARN no requieren una complementariedad de secuencia absoluta para unirse a un mRNA, lo que les permite regular una amplia gama de transcritos diana. Los miARN típicamente se unen a secuencias diana con espacios entre nucleótidos emparejados. Como se usa en el presente documento, la expresión "complementariedad de secuencia absoluta" pretende describir un requisito de que cada par de nucleótidos a lo largo de la longitud de dos secuencias, p. ej., un miARN y un gen o transcripción diana, se unen sin huecos. El término "complementario" pretende describir dos secuencias en las que al menos aproximadamente el 50% de los nucleótidos se unen de una secuencia a la otra secuencia en trans.

Los miARN son frecuentemente complementarios a la UTR 3' del transcrito de ARNm, sin embargo, los miARN de la invención pueden unirse a cualquier región de un ARNm diana. Alternativamente o, además, los miARN reconocen los sitios genómicos de metilación que corresponden a los genes que codifican los mRNA reconocidos. El estado de metilación del ADN genómico determina en parte la accesibilidad de ese ADN a los factores de transcripción. Como tal, la metilación y desmetilación del ADN regulan el silenciamiento y la expresión de los genes, respectivamente.

Los miARN para uso en la invención incluyen las secuencias en la Tabla 1 (SEQ ID N°: 1 a 5) y sus homólogos y análogos, a moléculas precursoras de miARN y a moléculas de ADN que codifican dichos miARN.

Tabla 1

miR204 de ratón	SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2
miR204 humano	SEQ ID NO: 3
miR211 de ratón	SEQ ID NO: 4
miR211	SEQ ID NO: 5

Hay dos versiones de la secuencia madura de ratón miR-204: 5'-UUCCCUUUGUC AUCCUAUGCCU-S' (SEQ ID NO: 1; n°. de entrada de miRBase MIMAT0000237) y 5'-UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCUG-S' (SEQ ID NO: 2; N°. de entrada de GenBank AJ560745). Según la observación de un doblete administrado de cerca, ambos pueden existir en ratones. El miR-204 maduro humano tiene la secuencia 5'-UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU-3' (SEQ ID NO: 3; miRBase N°. de entrada MIMAT0000265). La secuencia de miARN-211 de ratón maduro es 5'-UUCCCUUUGUCAUCCUUUGCCU-S'; SEQ ID N°: 4 (n°. de entrada de miRBase MIMAT0000668). El miR-211 maduro humano tiene la secuencia 5'-UUCCCUUUGUC AUCCUUGCCU-3' (SEQ ID NO: 5; n°. de entrada de miRBase MIMAT0000268).

Preferiblemente, la identidad de un homólogo con una secuencia de SEQ ID NOs 1-5 puede ser al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% idéntica.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es, al menos, un agente capaz de aumentar el nivel de uno o más miARN en una célula o células de un sujeto, comprendiendo dicho miARN la secuencia UUCCCUU semilla, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una distrofia retiniana.

La secuencia UUCCCUU es una secuencia semilla. La región semilla forma un dúplex firme con el ARNm diana. La mayoría de los miARN imperfectamente en el par de bases con la región no traducida (UTR) 3' de los ARNm diana, y la región "semilla" proximal 5' de los miARN proporciona la mayor parte de la especificidad de emparejamiento. Sin estar vinculado a ninguna teoría, se cree que los primeros nueve nucleótidos de miARN (que abarcan la secuencia semilla) proporcionan una mayor especificidad, mientras que los ribonucleótidos de miARN 3' de esta región permiten una menor especificidad de secuencia y, por lo tanto, toleran un mayor grado de emparejamiento de bases no coincidentes. siendo las posiciones 2-7 las más importantes.

En la presente invención, el agente se selecciona del grupo que consiste en: un miARN, un precursor de miARN, un

miARN maduro, un mimético de miARN o una mezcla de miméticos de miARN, una molécula de ADN que codifica dicho miARN, para dicho precursor de miARN, para dicho miARN maduro, para dicho mimético de miARN o mezcla de miméticos de miARN, o cualquiera de sus combinaciones, en el que dicho agente comprende la secuencia semilla UUCCUU o codifica una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia semilla UUCCUU.

- 5 Más preferiblemente, al menos un miARN que comprende la secuencia semilla UUCCUU es la secuencia madura de miR-204 o la secuencia madura de miR-211.

Cabe señalar que los miARN maduros generalmente pueden tener una longitud de aproximadamente 19-24 nucleótidos (y cualquier intervalo entre ellos), particularmente 21, 22 ó 23 nucleótidos. Los miARN, sin embargo, también pueden proporcionarse como un precursor que puede tener una longitud de aproximadamente 70 a 100 nucleótidos (pre-miARN). Debe observarse que el precursor puede producirse mediante el procesamiento de un transcrito primario que puede tener una longitud superior a aproximadamente 100 nucleótidos (pri-miARN). El miARN como tal generalmente puede ser una molécula monocatenaria, mientras que el miARN-precursor generalmente puede estar en forma de una molécula al menos parcialmente autocomplementaria capaz de formar porciones bicatenarias, p. ej. estructuras de vástago y bucle. Las moléculas de ADN que codifican las moléculas de miARN, pre-miARN y pri-miARN también están incluidas en la invención. Los ácidos nucleicos pueden seleccionarse de ARN, ADN o moléculas análogas de ácido nucleico, tales como ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos modificados en el azúcar o la estructura. Debe señalarse, sin embargo, que también pueden ser adecuados otros análogos nucleicos, tales como los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o los ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

- 20 Las moléculas de ácido nucleico para usar en la invención pueden obtenerse mediante métodos de síntesis química o mediante métodos recombinantes, por ejemplo, por transcripción enzimática de plantillas de ADN sintético o de plásmidos de ADN aislados de organismos recombinantes. Normalmente, las ARN-polimerasas de fago se utilizan para la transcripción, como las ARN-polimerasas T7, T3 o SP6.

La descripción también puede relacionarse con un vector de expresión recombinante que comprenda un ácido nucleico recombinante unido operativamente a una secuencia de control de la expresión, en donde la expresión, es decir, la transcripción y, opcionalmente, el procesamiento posterior da como resultado una molécula de miARN o una molécula precursora de miARN (pre-o pre-miARN) como se describe anteriormente. El vector puede ser un vector de expresión adecuado para la expresión de ácidos nucleicos en células eucarióticas, más particularmente, en mamíferos. El ácido nucleico recombinante contenido en dicho vector puede ser una secuencia que resulte en la transcripción de la molécula de miARN como tal, un precursor o su transcrito primario, que pueda procesarse adicionalmente para dar la molécula de miARN.

Más preferiblemente, dicho agente comprende la secuencia madura de miR-204 o la secuencia madura de miR-211.

- 35 En una realización preferida, se proporciona dicho agente para usar en el tratamiento y/o prevención de una distrofia retiniana dentro de un vehículo de administración, en el que el vehículo de administración se selecciona opcionalmente de un vector viral, microesferas, liposomas, partículas de oro coloidal, lipopolisacáridos, polipéptidos, polisacáridos o pegilación de vehículos virales.

En una realización preferida, la distrofia retiniana se caracteriza por la degeneración de los fotorreceptores. Preferiblemente, la distrofia retiniana es una distrofia retiniana hereditaria. Más preferiblemente, la degeneración retiniana hereditaria se selecciona del grupo que consiste en: Retinitis Pigmentosa (RP), Amaurosis Congénita de Leber (ACV), distrofias de bastones y conos y distrofias de conos.

Un objeto adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende al menos un agente capaz de aumentar el nivel de uno o más miARN, comprendiendo dicho miARN la secuencia semilla UUCCUU como se define anteriormente, y excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento. y/o la prevención de una distrofia retiniana.

- 45 Dicho agente se selecciona del grupo que consiste en: un miARN, un precursor de miARN, un miARN maduro, un mimético de miARN o una mezcla de miméticos de miARN, una molécula de ADN que codifica dicho miARN, para dicho precursor de miARN, para dicho miARN maduro, para dicho mimético de miARN o mezcla de miméticos de miARN, o cualquiera de sus combinaciones, donde dicho agente comprende la secuencia semilla UUCCUU o codifica una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia semilla UUCCUU, más preferiblemente dicho agente comprende la secuencia madura de miR-204 o la secuencia madura de miR-211.

Un objeto adicional de la invención es una secuencia de ácido nucleico que codifica el agente como se define anteriormente para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una distrofia retiniana.

- 55 Un objeto adicional de la invención es un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de codificación para el agente como se define anteriormente bajo el control de un promotor adecuado para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una distrofia retiniana.

Preferiblemente, el promotor adecuado es la secuencia del promotor de rodopsina.

Más preferiblemente, el vector de expresión recombinante, como se define anteriormente, comprende además una o más formas naturales de una secuencia de codificación mutada responsable de la distrofia retiniana bajo el control de un promotor adecuado. Preferiblemente, el promotor adecuado es la secuencia del promotor de la rodopsina o un promotor que dirige la expresión en el RPE.

- 5 Preferiblemente, una o más formas naturales de la secuencia de codificación mutada responsable de la distrofia retiniana se seleccionan del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 23 a SEQ ID NO: 414.

Cualquier combinación de la SEQ ID N°: 23 a la SEQ ID N°: 414 es adecuada para la presente invención.

Preferiblemente, la forma natural de la secuencia de codificación mutada es la secuencia de codificación de AIPL1.

En una realización preferida, el vector de expresión recombinante, como se define anteriormente, es un derivado de AAV.

- 10 Un objeto adicional de la invención comporta una célula huésped para usar en el tratamiento y/o la prevención de una distrofia retiniana que comprende el vector de expresión recombinante como se define anteriormente.

Un objeto adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende la secuencia de ácido nucleico, como se definió anteriormente, o el vector de expresión recombinante, como se definió anteriormente, o la célula hospedadora, como se definió anteriormente, y excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una distrofia retiniana.

- 15

Preferiblemente, la composición farmacéutica comprende además una o más formas naturales de una secuencia de codificación mutada responsable de la distrofia retiniana bajo el control de un promotor adecuado.

Preferiblemente, la forma natural de la secuencia de codificación mutada responsable de la distrofia retiniana se inserta en otro vector de expresión recombinante independiente o separado.

- 20 Preferiblemente, en la composición farmacéutica definida anteriormente, una o más formas naturales de la secuencia de codificación mutada responsable de la distrofia retiniana se seleccionan del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 23 a SEQ ID NO: 414.

Preferiblemente, la forma natural de la secuencia de codificación mutada es la secuencia de codificación de AIPL1. Preferiblemente, la composición farmacéutica, como se define anteriormente, para la administración intraocular.

- 25 Se contempla que los usos terapéuticos de la presente invención se pueden usar en combinación con otros métodos para tratar una distrofia retiniana. Otros agentes terapéuticos pueden incluir una molécula neuroprotectora tal como: factores de crecimiento tales como el factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), cardiotrofina-1, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) o los factores de viabilidad del cono derivados de los bastones, como RdCVF y RdCVF2.

- 30 En la presente invención, la forma natural de la secuencia de codificación mutada responsable de la distrofia retiniana, en particular caracterizada por la degeneración de fotorreceptores, en particular la distrofia retiniana hereditaria, se selecciona del grupo que consiste en los siguientes genes: ABHD12, ACBD5, ADAM9, ADAMTS18, AIPL1, ARL2BP, ARL6, BBIP1, BBS1, BBS10, BBS12, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, , C2orf2, C2orf71, C8orf71PPCJ090PPPJ0901PAC02C012, CACNA2D4, CDH23, CDH3, CDHR1, CEP290, CERKL, CIB2, CLRN1, CNGA1, CNGB1, CNNM4, CRB1, DFNB31, DHDDS, EMC1, EYS, FAM161A, GPR125, GPR98, GUCY2D, HARS, IDH3B, IMPG2, IQCB1, KCNJ13, KCNV2, KIAA1549, LCA5, LRAT, MAK, MERTK, MKKS, MKS1, MVK, MYO7A, NEK2, NMNAT1, OFD1, OTX2, PCDH15, PDE6A, PDE6B, PDE6C, PDE6G, PRCD, PROM1, RAB28, RAX2, RBP3, RD3, RDH12, RGR, RLBP1, RP2, RPE65, RPGR, RPGRIP1, SAG, SDCCAG8, SPATA7, TRIM32, TTC8, TTPA, TULP1, UNC119, USH1A, USH1C, USH1G, USH2A, ZNF513. Las secuencias de codificación relativas son las secuencias que consisten en la SEQ ID NO: 23 a la SEQ ID NO: 414.

- 45 Las distrofias retinianas hereditarias (IRDs) representan una de las causas más frecuentes de ceguera genética en el mundo occidental. La condición primaria que subyace a este grupo de enfermedades es la degeneración de los fotorreceptores, es decir, las células que convierten la información de la luz en señales químicas y eléctricas que luego se transmiten al cerebro a través de los circuitos visuales. Las IRD se pueden subdividir en diferentes grupos de enfermedades, a saber, Retinitis Pigmentosa (RP), Amaurosis Congénita de Leber (LCA), distrofias de conos y bastones y distrofias de conos. El agente trata y/o previene una o más de tales enfermedades.

- 50 En la presente descripción, los agentes contemplados capaces de aumentar el nivel de uno o más miARN pueden incluir moléculas de miARN, polinucleótidos de ARN o ADN de cadena sencilla o doble, ácidos nucleicos peptídicos (PNAs), proteínas, moléculas pequeñas, iones, polímeros, compuestos, anticuerpos, intracuerpos, antagonistas o cualquiera de sus combinaciones. El agente puede aumentar los niveles de expresión, actividad y/o función de miARN.

En algunos aspectos, el agente capaz de aumentar el nivel de uno o más miARN puede ser una molécula de ARN o ADN, que puede contener al menos un análogo de nucleótido modificado, es decir, un ribonucleótido o desoxirribonucleótido natural se sustituye por un nucleótido no natural. El análogo de nucleótido modificado puede

ubicarse, por ejemplo, en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la molécula de ácido nucleico.

Los análogos de nucleótidos pueden seleccionarse de ribonucleótidos modificados en el azúcar o en la estructura. Sin embargo, debe observarse que también pueden ser adecuados ribonucleótidos modificados en la nucleobase, es decir, ribonucleótidos, que contienen una nucleobase no natural en lugar de una nucleobase natural, como las uridinas o citidinas modificadas en la posición 5, por ejemplo, 5-(2-amino)propil-uridina, 5-bromo-uridina; adenosinas y guanosinas modificadas en la posición 8, p. ej. 8-bromo guanosina; nucleótidos de deaza, por ejemplo, 7-deaza-adenosina; nucleótidos alquilados en O y N, p. ej. N6-metil adenosina. En los ribonucleótidos modificados en el azúcar, el grupo 2'-OH se reemplaza por un grupo seleccionado de H, OR, R, halo, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub> o CN, en donde R es alquilo C1-C6, alqueno o alquino y halo es F, Cl, Br o I. En los ribonucleótidos modificados en la estructura preferidos, el grupo fosfoéster que se conecta a los ribonucleótidos adyacentes se reemplaza por un grupo modificado, por ejemplo, del grupo fosfotioato. Cabe señalar que las modificaciones anteriores pueden ser combinadas.

En la presente invención, los "miméticos de miR" son pequeños oligonucleótidos de ARN de doble cadena, que pueden modificarse químicamente y que imitan a los miARN endógenos y permiten el análisis funcional de los miARN mediante la regulación positiva de la actividad del miARN. La secuencia mimética corresponde a la secuencia de la secuencia madura de miARN.

En la presente invención, la degeneración de los fotorreceptores es el deterioro progresivo y, en última instancia, la muerte de las células fotorreceptoras.

La degeneración y muerte de los fotorreceptores son las condiciones principales que subyacen a la degeneración hereditaria de los fotorreceptores, en particular la degeneración hereditaria de los fotorreceptores como en las distrofias retinianas hereditarias. En la degeneración de los fotorreceptores, la diferenciación y proliferación anormales de RPE no desempeñan funciones patógenas clave.

El agente de la presente invención tiene una actividad terapéutica en la degeneración de los fotorreceptores, que es un efecto distinto al de la diferenciación o proliferación de las células epiteliales.

En la presente invención, miR-204/211 significa miR-204 y/o miR-211. La mayoría de los miARN imperfectamente en el par de bases con la región no traducida (UTR) 3' del ARN diana, y la región "semilla" proximal 5' de los miARN proporcionan la mayor parte de la especificidad de emparejamiento. Sin estar ligado a ninguna teoría, se cree que los primeros nueve nucleótidos de miARN (que abarcan la secuencia semilla) proporcionan una mayor especificidad, mientras que los ribonucleótidos de miARN 3' de esta región permiten una menor especificidad de secuencia y, por lo tanto, toleran un mayor grado de emparejamiento de bases no coincidentes, siendo las posiciones 2-7 las más importantes. Los miméticos de miR-204 y miR-211 pueden producirse mediante muchas técnicas conocidas en la técnica. El grupo hidroxilo 2' de los azúcares de ribosa se puede alquilar, tal como por metilación, para aumentar la estabilidad de la molécula. Además, los azúcares de ribosa pueden modificarse reemplazando el grupo hidroxilo en la posición 2' con un hidrógeno, generando así un esqueleto de ADN. Además, cualquier base de uracilo de una secuencia de ARN puede reemplazarse por timina. Estos son solo algunos ejemplos no limitativos de las posibles modificaciones que puede realizar un experto en la técnica.

En la presente invención, miR-204 y/o miR-211 pueden administrarse a la retina a través de la inyección subretiniana de constructos de AAV. Sin embargo, es importante señalar que las formas maduras de los miARN también podrían administrarse a la retina como oligonucleótidos de ARN de doble cadena (miméticos de microARN) cuya liberación puede mejorarse mediante la conjugación con otras estructuras moleculares o la encapsulación con vehículos tales como liposomas o nanopartículas (24). Además, tanto las construcciones de miR-204/211 AAV como los miméticos de miR-204/211 también se pueden preparar en forma de una suspensión inyectable, loción ocular o pomada oftálmica que se puede administrar en la retina con un procedimiento no invasivo.

La administración de oligonucleótidos se puede llevar a cabo mediante métodos conocidos, en los que se introduce un ácido nucleico en una célula diana deseada in vitro o in vivo. Un aspecto de la presente descripción comprende una construcción de ácido nucleico comprendida dentro de un vehículo de liberación. Un vehículo de administración es una entidad por la cual una secuencia de nucleótidos puede ser transportada desde al menos un medio a otro. Los vehículos de administración pueden usarse generalmente para la expresión de las secuencias codificadas dentro de la construcción de ácido nucleico y/o para la administración intracelular de la construcción. Está dentro del alcance de la presente descripción que el vehículo de administración pueda ser un vehículo seleccionado del grupo de vehículos basados en ARN, vehículos/vectores basados en ADN, vehículos basados en lípidos, vehículos basados en virus y vehículos basados en células. Los ejemplos de dichos vehículos de administración incluyen: microesferas poliméricas biodegradables, formulaciones basadas en lípidos, como los vehículos de liposomas, recubriendo la construcción sobre partículas de oro coloidal, lipopolisacáridos, polipéptidos, polisacáridos, pegilación de vehículos virales.

Un ejemplo de la descripción puede comprender un virus como vehículo de administración, en el que el virus puede seleccionarse de: adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus asociados a adeno, virus del herpes, virus de la vacuna, virus espumosos, citomegalovirus, virus del bosque de Semliki, virus de la viruela, vector del virus ARN y vector del

virus ADN. Tales vectores virales son muy conocidos en la técnica. Las técnicas de transferencia génica utilizadas comúnmente incluyen fosfato de calcio, DEAE-dextrano, transfección, electroporación y microinyección y métodos virales (30-34). Otra técnica para la introducción del ADN en las células es el uso de liposomas catiónicos (35). Las formulaciones de lípidos catiónicos disponibles en el mercado son, p. ej., Tfx 50 (Promega) o Lipofectamin 2000 (Life Technologies). Las composiciones pueden estar en forma de una solución, p.ej. una solución inyectable, una crema, unguento, tableta, suspensión o similar. La composición se puede administrar de cualquier manera adecuada, p.ej. por inyección, particularmente por inyección intraocular, por vía oral, tópica, nasal, rectal, etc. El vehículo puede ser cualquier vehículo farmacéutico adecuado. Preferiblemente, se usa un vehículo, que es capaz de aumentar la eficacia de las moléculas de ARN para entrar en las células diana. Ejemplos adecuados de tales vehículos son los liposomas, particularmente los liposomas catiónicos. Un aspecto de la presente descripción abarca además composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más miARN o miARN para su administración a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para la administración in vivo. Los miARN de la invención pueden proporcionarse dentro de vectores de expresión como se describió anteriormente que se formulan en una composición farmacéutica adecuada.

Por "forma biológicamente compatible adecuada para la administración in vivo" se entiende una forma de la sustancia a administrar en la cual cualquier efecto tóxico es superado por los efectos terapéuticos. La administración de una cantidad terapéuticamente activa de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, o una "cantidad efectiva", se define como una cantidad efectiva en dosis y por períodos de tiempo, necesarios para lograr el resultado deseado de aumentar/disminuir la producción de proteínas. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una sustancia puede variar de acuerdo con factores tales como el estado/salud de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del receptor, y la capacidad inherente del polipéptido particular, la codificación de su ácido nucleico, o el virus recombinante para provocar la respuesta deseada. El régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse diariamente varias dosis divididas o en intervalos periódicos, y/o la dosis puede reducirse proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica. La cantidad de miARN o del modulador de miARN para la administración dependerá de la vía de administración, el tiempo de administración y variará de acuerdo con las respuestas individuales del sujeto. Las vías de administración adecuadas son inyecciones intramusculares, inyecciones subcutáneas, inyecciones intravenosas o inyecciones intraperitoneales, administración oral e intranasal. En el caso de IRD, puede preferirse inyectar la composición basada en el modulador de miARN y/o miARN en la retina del sujeto. La composición también se puede proporcionar a través de implantes, que pueden usarse para la liberación lenta de la composición a lo largo del tiempo.

En el caso de la degeneración de los fotorreceptores, como en los IRD (en particular, Retinitis Pigmentosa (RP), Amaurosis Congénita de Leber (LCA), distrofias de conos y bastones y distrofias de conos), las composiciones basadas en el modulador de miARN o miARN de la invención pueden administrarse tópicamente al ojo en volúmenes efectivos de aproximadamente 5 microlitros a aproximadamente 75 microlitros, por ejemplo de aproximadamente 7 microlitros a aproximadamente 50 microlitros, preferiblemente de aproximadamente 10 microlitros a aproximadamente 30 microlitros. Los miARN pueden ser altamente solubles en soluciones acuosas. La instilación tópica en el ojo de miARN en volúmenes superiores a 75 microlitros puede ocasionar la pérdida de miARN del ojo a través de derrames y drenaje. Por lo tanto, se prefiere administrar una alta concentración de miARN (por ejemplo, de 1 nM a 100  $\mu$ M, con un intervalo preferido entre 10 y 1000 nM) por instilación tópica en el ojo en volúmenes de aproximadamente 5 microlitros a aproximadamente 75 microlitros.

En un aspecto, la vía de administración parenteral puede ser la administración intraocular. La administración intraocular de la presente composición basada en miARN puede realizarse mediante inyección o administración directa (por ejemplo, tópica) en el ojo, siempre que la vía de administración permita que el miARN entre en el ojo. Además de las vías tópicas de administración al ojo descritas anteriormente, las vías de administración intraoculares adecuadas incluyen la administración intravítrea, intrarretiniana, subretiniana, subtenón, peri- y retro-orbital, transcorneal y transeccleral. Dichas vías de administración intraocular están dentro de la experiencia en la técnica (36-39).

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado, y puede usarse para transformar o transfectar cualquier huésped adecuado. Los vectores adecuados incluyen aquellos diseñados para la propagación y expansión o para la expresión o ambos, como plásmidos y virus. Los vectores de expresión recombinantes se pueden preparar utilizando técnicas estándar de ADN recombinante descritas, por ejemplo, en Sambrook et al., supra, y Ausubel et al., supra. Las construcciones de vectores de expresión, que son circulares o lineales, pueden prepararse para contener un sistema de replicación funcional en una célula huésped procariota o eucariota.

Los sistemas de replicación pueden derivarse, por ejemplo, de ColEI, plásmido 2  $\mu$ ,  $\lambda$ , S V40, virus del papiloma bovino y similares.

Deseablemente, el vector de expresión recombinante comprende secuencias reguladoras, tales como los codones de iniciación y terminación de la transcripción y traducción, que son específicos para el tipo de huésped (p. ej., bacterias, hongos, plantas o animales) en los que se introducirá el vector, cuando sea apropiado y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o ARN. El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes

5 marcadores, que permiten la selección de hospedadores transformados o transfectados. Los genes marcadores incluyen la resistencia a biocidas, por ejemplo, la resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., complementación en un huésped auxotrófico para proporcionar prototrofia, y similares. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión de la invención incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina/G418, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina y genes de resistencia a ampicilina. El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o normativo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el miR 204, miR 211 y/o sus miméticos (incluidas las porciones funcionales y sus variantes funcionales), o la secuencia de nucleótidos que es complementaria o que hibrida a la secuencia de nucleótidos que codifica el ARN. La selección de promotores, por ejemplo, fuerte, débil, inducible, específicos de tejido y específicos del desarrollo, está dentro de la habilidad ordinaria del experto. De manera similar, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor también está dentro de la habilidad del experto. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor S V40, un promotor RSV y un promotor encontrado en la repetición terminal larga del virus de células madre murinas. El promotor preferido es el promotor de rodopsina.

15 Los vectores de expresión recombinantes pueden diseñarse para su expresión transitoria, para su expresión estable o para ambos. Además, los vectores de expresión recombinantes se pueden preparar para su expresión constitutiva o para su expresión inducible.

20 La descripción proporciona además una célula huésped que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos en el presente documento. Como se usa en el presente documento, la expresión "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de célula que pueda contener el vector de expresión recombinante de la invención. La célula huésped puede ser una célula eucariota, por ejemplo, una planta, un animal, un hongo o un alga, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, una bacteria o un protozoo. La célula huésped puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo, un ser humano. La célula huésped puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crezca en suspensión. Las células hospedadoras adecuadas son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, DH5 $\alpha$ , células de E. coli, células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293 y similares. Para los fines de amplificar o replicar el vector de expresión recombinante, la célula huésped es preferiblemente una célula procariótica, por ejemplo, una célula DH5 $\alpha$ .

30 Las expresiones "tratar o tratamiento" y "prevenir o prevención", así como las palabras derivadas de los mismos, como se usan en este documento, no implican necesariamente el 100% del tratamiento o la prevención completos. Más bien, existen diversos grados de tratamiento o prevención, de los cuales cualquier experto en la técnica reconoce que tiene un beneficio potencial o efecto terapéutico; a este respecto, los métodos pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención de una afección asociada con miR 204 y/o miR 211, por ejemplo, en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención provistos por el método pueden incluir el tratamiento o la prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad que se está tratando o previniendo. Además, para los fines del presente documento, "prevención" puede abarcar el retraso del inicio de la enfermedad, o de sus síntomas o condiciones. Una "cantidad efectiva" se refiere a una dosis que es adecuada para prevenir o tratar una enfermedad o trastorno caracterizado por la degeneración de fotorreceptores en un individuo. Las cantidades efectivas para un uso terapéutico o profiláctico dependerán, por ejemplo, de la etapa y la gravedad de la enfermedad o del trastorno que se esté tratando, la edad, el peso y el estado general de salud del paciente, y el juicio del médico que prescribe. El tamaño de la dosis también estará determinado por el compuesto seleccionado, el método de administración, el tiempo y la frecuencia de administración, así como la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar la administración de un compuesto en particular y el efecto fisiológico deseado. Cualquier experto en la técnica apreciará que las diversas enfermedades o trastornos pueden requerir un tratamiento prolongado que implique múltiples administraciones, tal vez utilizando miR 204, miR 211 y/o sus miméticos en cada una o varias rondas de administración. Un miR y sus miméticos pueden administrarse en una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que puede comprender al menos un excipiente (por ejemplo, un excipiente farmacéuticamente aceptable), así como otros agentes terapéuticos (por ejemplo, otros miR y/o sus miméticos). La composición puede administrarse por cualquier vía adecuada, incluida la administración parenteral, tópica, oral o local.

55 El excipiente farmacéuticamente aceptable es preferiblemente uno que sea químicamente inerte al miR, y/o sus miméticos y uno que tenga poco o ningún efecto secundario o toxicidad en las condiciones de uso. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, Cremophor EL (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), propilenglicol, polietilenglicol, alcohol y sus combinaciones. La elección del vehículo se determinará en parte por el miR particular y/o sus miméticos, así como por el método particular utilizado para administrar la composición. Por consiguiente, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de la composición.

60 La composición farmacéutica en el contexto de una realización de la invención puede estar, por ejemplo, en forma de píldora, cápsula o tableta, conteniendo cada una de las cuales una cantidad predeterminada de uno o más de los compuestos activos y estando preferiblemente revestida para facilitar la deglución, en forma de polvo o gránulos, o en forma de solución o suspensión. Para la administración oral, los polvos o gránulos finos pueden contener agentes diluyentes, dispersantes y/o tensioactivos y pueden estar presentes, por ejemplo, en agua o en un jarabe, en

cápsulas o sobres en estado seco, o en una solución o suspensión no acuosa, en donde pueden incluirse agentes de suspensión, o en tabletas en donde se pueden incluir aglutinantes y lubricantes. También pueden estar presentes componentes tales como edulcorantes, agentes aromatizantes, conservantes (por ejemplo, conservantes antimicrobianos), agentes de suspensión, agentes espesantes y/o agentes emulsionantes en la composición farmacéutica. Cuando se administra en forma de una solución o suspensión líquida, la formulación puede contener uno o más de los compuestos activos y agua purificada. Los componentes opcionales en la solución o suspensión líquida incluyen conservantes adecuados (por ejemplo, conservantes antimicrobianos), agentes tamponantes, disolventes y sus mezclas. Un componente de la formulación puede servir para más de una función. Se pueden usar conservantes. Los conservantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, metilparabeno, propilparabeno, benzoato de sodio y cloruro de benzalconio. Se puede usar una mezcla de dos o más conservantes opcionalmente. El conservante o sus mezclas están presentes típicamente en una cantidad de aproximadamente 0,0001% a aproximadamente 2% en peso de la composición total. Los agentes tamponantes adecuados pueden incluir, por ejemplo, ácido cítrico, citrato de sodio, ácido fosfórico, fosfato de potasio y varios otros ácidos y sales. Puede usarse opcionalmente una mezcla de dos o más agentes tamponantes. El agente tampón o sus mezclas están presentes típicamente en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 4% en peso de la composición total. Las siguientes formulaciones para administración oral, en aerosol, parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intradérmica, interperitoneal e intratecal) y rectal son meramente ejemplares y de ninguna manera son limitantes.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden consistir en (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad efectiva del compuesto disuelto en diluyentes, como agua, solución salina o jugo de naranja; (b) cápsulas, sobres, tabletas, pastillas y trociscos, cada uno con una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y los alcoholes de polietileno, con o sin la adición de un tensioactivo, agente de suspensión o agente emulsionante farmacéuticamente aceptable. Las formas de cápsulas pueden ser del tipo ordinario de gelatina de cubierta dura o blanda que contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y rellenos inertes, como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio y almidón de maíz. Las formas de comprimidos pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, celulosa microcristalina, goma arábiga, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa de sodio, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes desintegrantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes y vehículos farmacológicamente compatibles. Las formas de pastillas pueden comprender el ingrediente activo en un aromatizante, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto, así como las pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga, emulsiones, geles y similares que contienen, además del ingrediente activo, los vehículos conocidos en la técnica. Los miRs y sus miméticos, solos o en combinación con otros componentes adecuados, pueden convertirse en formulaciones de aerosol para ser administrados por inhalación. Estas formulaciones de aerosol se pueden colocar en propelentes aceptables a presión, como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. También pueden formularse como productos farmacéuticos para preparaciones sin presión, como en un nebulizador o un atomizador. Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles isotónicas, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor deseado, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. El miR y sus miméticos pueden administrarse en un diluyente fisiológicamente aceptable en un vehículo farmacéutico, como un líquido estéril o una mezcla de líquidos, que incluyen agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, un alcohol, como etanol, isopropanol o alcohol hexadecílico, glicoles, como propilenglicol o polietilenglicol, cetales de glicerol, como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, como el poli(etilenglicol) 400, un aceite, un ácido graso, un éster de ácido graso o glicérido, o un glicérido de ácido graso acetilado con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, como un jabón o un detergente, un agente de suspensión, como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

Los aceites, que se pueden usar en las formulaciones parenterales, incluyen aceites de petróleo, de animales, vegetales o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen maní, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, vaselina y minerales. Los ácidos grasos adecuados para su uso en las formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isostárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.

Los jabones adecuados para su uso en las formulaciones parenterales pueden incluir sales de metales alcalinos grasos, amonio y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetil dialquil amonio y haluros de alquilpiridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicéridos, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos y copolímeros de polioxietileno-polipropileno, (d) detergentes anfóteros como, por ejemplo, alquil-beta-aminopropionatos y sales de amonio cuaternario de 2-alquilimidazolina, y (3) sus mezclas.

Se pueden usar conservantes y tampones adecuados en tales formulaciones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el lugar de la inyección, tales composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tengan una relación hidrófila-lipófila (HLB) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en tales formulaciones varía de aproximadamente 5% a aproximadamente 15% en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polietileno, tales como monooleato de sorbitán y los aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados por la condensación del óxido de propileno con el propilenglicol. Las formulaciones parenterales pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitarias o de dosis múltiples, como ampollas y viales, y pueden almacenarse en un estado liofilizado que requiera solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para la inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles.

Los miRs y sus miméticos pueden administrarse como una formulación inyectable. Los requisitos de los vehículos farmacéuticos eficaces para las composiciones inyectables son muy conocidos por los expertos ordinarios en la técnica. Consulte *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, JB Lippincott Co., Philadelphia, Pensilvania, Banker and Chalmers, eds., Páginas 238-250 (1982), y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ª ed., páginas 622-630 (1986). Las formulaciones tópicas, que incluyen aquellas que son útiles para la liberación transdérmica de fármacos, son bien conocidas por los expertos en la técnica y son adecuadas en el contexto de las realizaciones de la invención para su aplicación a la piel.

La concentración de un compuesto en las formulaciones farmacéuticas puede variar, por ejemplo, desde menos de aproximadamente el 1%, generalmente en el 10% o al menos aproximadamente el 10%, hasta del 20% al 50% o más en peso, y puede seleccionarse principalmente por volúmenes de fluidos y viscosidades, de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado. Los métodos para preparar composiciones administrables (por ejemplo, administrables por vía parenteral) son conocidos o evidentes para los expertos en la materia y se describen con más detalle, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Science* (17ª edición, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985). Además de las composiciones farmacéuticas antes descritas, los miR y sus miméticos pueden formularse como complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina, o liposomas. Los liposomas pueden servir para dirigir los miRs y los miméticos de los mismos a un tejido particular. Los liposomas también se pueden usar para aumentar la vida media de los miR y sus miméticos. Hay muchos métodos disponibles para preparar liposomas, como se describe, por ejemplo, en Szoka et al., *Ann. Rev. Biophys Bioeng.*, 9:467 (1980) y las patentes de EE.UU. 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

Cuando el agente, tal como un miR o su mimético de miR, se administra con uno o más agentes terapéuticos adicionales, pueden administrarse conjuntamente al mamífero uno o más agentes terapéuticos adicionales. Por "coadministración" se entiende la administración de uno o más agentes terapéuticos adicionales y el miR y/o sus miméticos lo suficientemente cerca en el tiempo tal que el miR y/o sus miméticos puedan mejorar el efecto de uno o más agentes terapéuticos adicionales. A este respecto, el miR y/o sus miméticos pueden administrarse primero y el uno o más agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse después, o viceversa. Alternativamente, el miR y/o sus miméticos, y el uno o más agentes terapéuticos adicionales, pueden administrarse simultáneamente. El agente terapéutico adicional puede ser un vector de expresión recombinante que comprenda la forma natural de la secuencia de codificación responsable de la distrofia retiniana hereditaria bajo el control de un promotor apropiado. Los agentes terapéuticos adicionales pueden incluir una molécula neuroprotectora tal como: factores de crecimiento tales como el factor neurotrófico ciliar (CNTF), el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF), cardiotrofina-1, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) o los factores de viabilidad del cono derivados de los bastones, como RdCVF y RdCVF2.

Los sistemas de administración útiles en el contexto de las realizaciones de la invención pueden incluir sistemas de administración de liberación prolongada, liberación retardada y liberación sostenida, de modo que la administración de la composición se produzca antes, y con el tiempo suficiente, para causar la sensibilización del sitio a ser tratado. La composición se puede usar junto con otros agentes terapéuticos o terapias. Dichos sistemas pueden evitar las administraciones repetidas de la composición, aumentando así la conveniencia para el sujeto y el médico, y pueden ser particularmente adecuados para las diversas composiciones descritas. Muchos tipos de sistemas de administración de liberación están disponibles y son conocidos por los expertos en la técnica. Incluyen los sistemas de bases de polímeros tales como poli(lactida-glicolida), copoloxalatos, policaprolactonas, poliésteramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polihidruros. Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.075.109. Los sistemas de administración también incluyen sistemas no poliméricos que son lípidos que incluyen esteroides como el colesterol, los ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras como los mono-, di- y tri-glicéridos; sistemas de liberación de hidrogel; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; revestimientos de cera; comprimidos prensados utilizando aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fundidos; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas de erosión en los que la composición activa está contenida en una forma dentro de una matriz como las que se describen en las patentes de EE. UU. 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034 y 5.239.660 y (b) sistemas difusionales en que un componente activo impregna a una velocidad controlada de un polímero tal como se describe en las Patentes de Estados Unidos 3.832.253 y 3.854.480. Además, se pueden usar sistemas de suministro de materiales basados en bombas, algunos de los cuales están adaptados para la implantación.

La invención se ilustrará a continuación por medio de ejemplos no limitativos que se refieren a las siguientes figuras.

Figura 1. Niveles de expresión de miR-204 en el ONL de ojos inyectados con AAV.CMV.premiR204. (A) Secciones de la retina antes (panel izquierdo) de la microdissección de captura con láser (LCM) y después (panel derecho). Las muestras microdisseccionadas que contenían la capa nuclear externa (ONL) se agruparon para la extracción del ARN. (B) análisis del perfil de expresión de miARN en el ONL recogido de LCM de tres animales inyectados subretinalmente con AAV a las 6 semanas de edad y sacrificados 3 semanas después. Los niveles de expresión se determinaron por RT-qPCR en el ARN total extraído de retinas inyectadas con AAV.CMV.premiR204 (204inj) y AAV.CMV.EGFP (EGFP). Los niveles de expresión de miARN individuales se normalizaron frente a los niveles de sno234, que sirvió como control. La administración subretinal del vector AAV.CMV.premiR204 confirió un aumento de 1,5 a 2 veces de miR-204 en comparación con los niveles endógenos. Los niveles de miR-124 no variaron significativamente. Abreviaturas: GCL, capa de células ganglionares; INL, capa nuclear interna; ONL, capa nuclear externa; RPE, epitelio pigmentario de la retina.

Figura 2. Análisis histológico de retinas de ratones *Aipl1*<sup>-/-</sup> después de la administración subretiniana de los vectores AAV.CMV.EGFP y AAV.CMV.premiR204 en P4. (A) Tinción DAPI de las secciones retinales en P21. Solo un bastón de núcleos está presente en la ONL de ojos de *Aipl1*<sup>-/-</sup> inyectados con el vector de control AAV.CMV.EGFP (recuadro en A). En cambio, hay un aumento en el número de bastones y la densidad de los núcleos en la ONL del ojo contralateral inyectado con el vector AAV.CMV.premiR204 (recuadro en B). Las otras capas de la retina (INL, IPL y GCL) parecen no verse afectadas. (C) Gráfico que muestra el número promedio de bastones de núcleos de fotorreceptores en los ojos tratados (n = 11) en comparación con los ojos contralaterales, inyectados con el vector de control. Abreviaturas: ONL, capa nuclear externa; INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa de células ganglionares.

Figura 3. Análisis inmunohistológico de retinas de ratones *Aipl1*<sup>-/-</sup> después de la administración subretiniana de los vectores AAV.CMV.EGFP y AAV.CMV.premiR204 en el día postnatal (P) 4. Imágenes de microscopía confocal del marcador de bastones rodopsina (A, B) y el marcador de conos arrestina (C, D) inmunomarcado en secciones de la retina en P21. Se observa una mayor tinción para los marcadores fotorreceptores de bastón y cono en la ONL de ojos inyectados con el vector AAV.CMV.premiR204 en comparación con los ojos contralaterales inyectados con el vector de control EGFP. La tinción DAPI de estas secciones se muestra en E y F. Abreviaturas: ONL, capa nuclear externa; INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa de células ganglionares.

Figura 4. Inmunomarcaje M-Opsina de retinas de ratones *Aipl1*<sup>-/-</sup> después de la administración subretiniana de los vectores AAV.CMV.EGFP y AAV.CMV.premiR204 en el día postnatal (P) 4. Imágenes de microscopía confocal del inmunomarcado del marcador de conos M-Opsina (A, B) en secciones de la retina en P21. Se observa un aumento de la tinción para Opsina M en la ONL de ojos inyectados con el vector AAV.CMV.premiR204 en comparación con los ojos contralaterales inyectados con el vector de control EGFP. La tinción con DAPI de estas secciones se muestra en C y D. Abreviaturas: ONL, capa nuclear externa; INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa de células ganglionares.

Figura 5. Preservación parcial de la estructura retiniana en ratones *Aipl1*<sup>-/-</sup> después de la administración combinada mediada por AAV de miR-204 y del gen *hAIPL1*. Tinción con DAPI de las secciones de la retina en P30 que muestran la conservación parcial del grosor de la retina (número de núcleos de células fotorreceptoras) en ratones *Aipl1*<sup>-/-</sup> después de la inyección subretiniana simultánea en P4 de dos vectores distintos: AAV.CMV.premiR204 en combinación con AAV.CMV.hAIPL1 (B), en comparación con los ojos contralaterales inyectados con AAV.CMV.hAIPL1 solo (A).

Figura 6. Función retiniana de ratones transgénicos P347S con rodopsina después de la administración de miR-204 mediada por AAV en el día 4 postnatal. En ratones P347S, la inyección subretiniana de AAV.CMV.premiR204 (n = 16) produce una mejoría de la función retiniana un mes después de la inyección, indicada por un aumento estadísticamente significativo en la amplitud ERG de onda b (P < 0,05), en comparación con los ojos contralaterales inyectados con el constructo de control AAV.CMV.EGFP (n = 16).

Figura 7. Función retiniana de ratones transgénicos con rodopsina P347S 2 meses después de la administración de miR-204 mediada por AAV en el día 4 postnatal. La mejora en la función retiniana, obtenida después de la administración subretiniana de AAV.CMV.premiR204 en ratones P347S fue persistente hasta al menos 2 meses después de la inyección, según lo indicado por el aumento en la amplitud ERG de la onda b, en ojos tratados (n = 7) en comparación con los ojos contralaterales inyectados con el control AAV.CMV.EGFP.

Figura 8. Análisis inmunohistoquímico de marcadores fotorreceptores en ratones P347S después de la administración de miR-204 mediada por AAV. Imágenes de microscopía confocal de inmunomarcaje con los marcadores de conos M-Opsina (A, B) y S-Opsina (E, F) en las secciones de la retina P40. Se observa un aumento de la tinción para estos marcadores en los ojos inyectados con los vectores AAV.CMV.premiR204 en comparación con los ojos de control controlaterales. La tinción DAPI de estas secciones se muestra en C, D, G y H, respectivamente. Abreviaturas: ONL, capa nuclear externa; INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interna; RPE, epitelio pigmentario de la retina.

- Figura 9. Reducción de la muerte celular retiniana en ratones P347S después de la administración de miR-204 mediada por AAV. (A, B) Imágenes de microscopía confocal de cortes de retina teñidos con TUNEL de ojos inyectados con AAV.CMV.premiR204 (B) y vectores de control (A). La tinción con DAPI de estas secciones se muestra en C y D. Abreviaturas: ONL, capa nuclear externa; INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interior. (E) El número de fotorreceptores positivos para TUNEL se cuantificó contando las secciones correspondientes de los ojos orientados en sección serial. Hay una reducción significativa (70%,  $P < 0,001$ ) en el número de células fotorreceptoras apoptóticas en la retina de ratones P347S después de la inyección de AAV.CMV.premiR204 en comparación con los ojos contralaterales inyectados con el vector de control ( $n = 5$  retina; las barras de error son SEM; \*\*\*  $p < 0,001$ ).
- Figura 10: Disminución de la gliosis retiniana en ratones P347S después de la administración de miR-204 mediada por AAV. Imágenes de microscopía confocal (A, B) de inmunomarcaje de anti-glutamina sintetasa (GS6) en secciones de retina P40. Se observó una disminución en el número de células de la microglía retiniana activadas (detectadas por tinción para GS6) en ojos inyectados con el vector AAV.CMV.premiR204 en comparación con los ojos de control contralaterales. La tinción con DAPI de estas secciones se muestra en C y D. Abreviaturas: ONL, capa nuclear externa; INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interior.
- Figura 11. Función retiniana de ratones transgénicos P347S con rodopsina después de la sobreexpresión de miR-204 mediada por AAV bajo el control de un promotor de rodopsina (específico para fotorreceptores) en el día 4 postnatal. En ratones P347S, la inyección subretiniana de AAV.RHO.premiR204 ( $n = 5$ ), en la que la expresión del premiR-204 está bajo el control de un promotor específico de fotorreceptores (Rodopsina), produce una mejora en la función de la retina, indicada por un aumento estadísticamente significativo en la amplitud ERG de la onda b en ojos tratados en comparación con ojos contralaterales inyectados con el control AAV.CMV.EGFP ( $n = 5$ ).
- Figura 12. La mejora de la función retiniana en ratones transgénicos con rodopsina P347S después de la administración mediada por AAV de miR-211 en el día 4 postnatal. En ratones P347S, la inyección subretiniana de AAV.CMV.premiR204 ( $n = 4$ ) y AAV.CMV.premiR211 ( $n = 9$ ) da como resultado un aumento muy similar en la amplitud ERG de la onda b en los ojos tratados comparado con los ojos contralaterales inyectados con el control AAV.CMV.EGFP ( $n = 7$ ).
- Figura 13. Análisis inmunohistoquímico de marcadores de fotorreceptores de conos en ratones P347S después de la administración de miR-211 mediada por AAV. Imágenes de microscopía por fluorescencia del inmunomarcaje de los marcadores de conos M-Opsina (A, B) y S-Opsina (E, F) en las secciones de la retina P40. Se observa un aumento de la tinción para estos marcadores en los ojos inyectados con los vectores AAV.CMV.premiR211 en comparación con los ojos de control controlaterales. La tinción DAPI de estas secciones se muestra en C, D, G y H, respectivamente. Abreviaturas: ONL, capa nuclear externa; INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa de células ganglionares.
- Figura 14. Función retiniana de ratones C57/BL6 naturales después de la administración de miR-204 mediada por AAV en estadios adultos. En ratones adultos naturales, la inyección subretiniana de AAV.CMV.premiR204 no altera la función retiniana, como lo indica la similitud en las respuestas ERG de la onda b, en los ojos tratados ( $n = 35$ ) en comparación con los ojos contralaterales, inyectados con el control AAV.CMV.EGFP ( $n = 35$ ).
- Figura 15. Función retiniana de ratones C57/BL6 naturales después de la administración de miR-204 mediada por AAV en el día 4 posterior al nacimiento. En crías naturales, la inyección subretiniana de AAV.CMV.premiR204 en el día 4 postnatal (P) no altera significativamente la función retiniana, como lo indica la similitud de las respuestas ERG de la onda b en los ojos tratados ( $n = 13$ ) en comparación con los ojos contralaterales, inyectados con el control AAV.CMV.EGFP ( $n = 12$ ).
- Figura 16. Función retiniana de ratones transgénicos P347S con rodopsina después de la administración de miR-204 mediada por AAV en el día 4 postnatal. En ratones P347S, la inyección subretiniana de AAV.CMV.premiR204 ( $n = 39$ ) produce una mejoría de la función retiniana un mes después de la inyección, indicada por un aumento estadísticamente significativo en la amplitud ERG de la onda b ( $P < 0,05$ ), en comparación con los ojos contralaterales inyectados con el constructo de control AAV.CMV.EGFP ( $n = 56$ ).
- Figura 17. Función retiniana de ratones C57/BL6 naturales después de la administración de miR-204/211 mediada por AAV en estadios adultos. En ratones adultos naturales, la inyección subretiniana de AAV.RHO.premiR204/miR211 no altera la función retiniana, como lo indica la similitud en las respuestas ERG de la onda b, en los ojos tratados ( $n = 11$ ) en comparación con los ojos contralaterales, inyectados con el control AAV.RHO.EGFP ( $n = 11$ ).
- Figura 18. Expresión de miR-204/211 en secciones retinianas de ratones adultos naturales. ARN ISH para miR-204 utilizando una sonda de detección de LNA miRCURY™ (Exiqon). En la retina neural, miR-204/211 se expresa fuertemente en INL y GCL mientras que no se detecta expresión en las capas de fotorreceptores (ONL y OS). Abreviaturas: GCL, Capa Celular Ganglionar; INL, Capa Nuclear Interna; IPL, Capa Plexiforme Interna; ONL, Capa Nuclear Exterior.
- Figura 19. Función retiniana de ratones knock-out miR-211 a los 3 meses. Se observó una disminución

estadísticamente significativa en la amplitud de ERG de la onda b ( $P < 0,05$ ) en ratones KO miR-211 homocigotos (OMO) y heterocigotos (HET) en comparación con los naturales (WT).

Figura 20. El ojo humano. a) Representación esquemática del ojo humano b) Sección transversal de la retina humana, que muestra su estructura laminada, que consiste en: (1) la capa de células ganglionares, cuyos axones forman el nervio óptico, que conecta la retina con el cerebro; (2) la capa nuclear interna, que contiene neuronas de segundo orden, como las células bipolares, amacrinas y horizontales; (3) la capa nuclear externa del fotorreceptor (PR), que contiene los cuerpos celulares y los núcleos de las PR de bastones y conos; (4) los segmentos externos PR, que están densamente empaquetados con discos que contienen opsina y están separados de los segmentos internos y cuerpos celulares por un estrecho cilio de conexión de 200-500 nm de largo (no visible); y (5) el epitelio pigmentario de la retina (RPE), una monocapa de células que contienen uniones estrechas que separan la retina neural de la coroides, que suministra sangre al RPE y PR (retina externa). Téngase en cuenta que las células PR están presentes en las capas (3) y (4) y son claramente distintas del RPE (5). Modificado de: Degeneración de fotorreceptores: disección genética y mecanicista de un rasgo complejo. Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM, Bhattacharya SS. Nat Rev Genet. 2010 Abr; 11(4): 273-84.

15 **Descripción detallada de la invención**

Materiales y métodos

Secuencias

>hsa-mir-204 SEQ ID NO: 6

GGCUACAGUCUUUCUUAUGUGACUCGUGGACUUCCUUUGUCAUCCUAUGCCUGAGAAUAUAUGAAGGAGGCUGGGAA  
GGCAAAGGGACGUUCAAUUGUCAUCACUGGC

20 -Secuencia madura (en negrita) de la base 33 a la base 54

-Secuencia semilla (subrayada) de la base 33 a la base 39

>mmu-mir-204 SEQ ID NO: 7

UGGACUUCCUUUGUCAUCCUAUGCCUGAGAAUAUAUGAAGGAGGCUGGGAAAGGCAAAGGGACGUUCA

-Secuencia madura (en negrita) de la base 6 a la base 27

25 -Secuencia semilla (subrayada) de la base 6 a la base 12

>hsa-mir-211 SEQ ID NO: 8

UCACCUGGCCAUGUGACUUGUGGGCUUCCUUUGUCAUCCUUCGCCUAGGGCUCUGAGCAGGGCAGGGACAGCAAAGGG  
GUGCUCAGUUGUCACUUCCACAGCACGGAG

-Secuencia madura (en negrita) de la base 26 a la base 47

-Secuencia semilla (subrayada) de la base 26 a la base 32

30 >mmu-mir-211 SEQ ID NO: 9

CUGCUUGACCUGUGACCUUGUGGGCUUCCUUUGUCAUCCUUGCCUAGGCCUCUGAGUGAGGCAAGGACAGCAAAGGG  
GGGCUCAGUGGUCACCUCUACUGCAGA

-Secuencia madura (en negrita) de la base 26 a la base 47

-Secuencia semilla (subrayada) de la base 26 a la base 32

>pAAV.CMV.premiR204 SEQ ID N.º: 10

35 La secuencia subrayada es la secuencia del pre-miR204

ES 2 697 249 T3

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACA  
GGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG  
CACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT  
TTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAATTAAGGCTGCGCGCTCGCTCGCT  
CACTGAGGCCGCCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGA  
GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCCCTTGTAGTTAATGATTAACCC  
GCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGATCGGAATTCGCCCTTAAGCTAGCTAGTT  
ATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAC  
TTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGT  
ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTAT  
TTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGAC  
GTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACT  
TGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAAT  
GGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGT  
TTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAAC TCCGCCCATGACGCAA  
ATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGATC  
CTGCAGAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGA  
CCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCT  
TACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCAGGCGGCCGCTGTTCAGGACTTGGCTA  
AGCATTGCTTTGAACAAAATATCAAACAAGGACTCAAGGGGCAGAGAATGCTGGTCAGTGGCTAAG  
ATGCCGGAGAATCAAGATGAGCAGGAAATGAAGAGGTTGGCTAAGAGGGGCAGAGGAGGCAGGCGG  
AGGAGCTCCTGACCGTGTACCATGGCTACAGTCCTTCTTCATGTGACTCGTGGACTTCCCTTTGTC  
ATCCTATGCCTGAGAATATATGAAGGAGGCTGGGAAGGCAAAGGGACGTTCAATTGTCATCACTGG  
CATCTTTTTTGATCATTACCCATCATCAAAGCATTTGGATAACCATAACATGAAAATTACCATC  
ATTGAGCCCATAACTTTCCTAAGACAAGGGTGACAATTTGAAACATCAAAGAACCTTACCCAGGGA

ATTCAGAAGTGAGAAGAGTGAATCAGATTCTCCCAGATTAACAACCCCATGTTGGATCCAATCAA  
 CCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTTACGCTA  
 TGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCC  
 TCCTTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTGTGTCAGGCAACGTGGC  
 GTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTC  
 CTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCC  
 CGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTGTCGGGGAAGCTGACG  
 TCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTC  
 CTTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCG  
 CGTCTTCGAGATCTGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCG  
 TGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCAT  
 CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGG  
 ATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGACTCGAGTTAAGGGCGAATTCCCGATTAGGATCTTC  
 CTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTG  
 ATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCC  
 CGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCCTTAATTAACCTAAT  
 TCACTGGCCGTCTTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTT  
 GCAGCACATCCCCCTTTCCGACGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAA  
 CAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGCGGGTGTG  
 GTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTC  
 CTTTCCCTTCTCGCCACGTTCCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGG  
 TTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTACAGTAGT  
 GGGCCATCGCCCCGATAGACGGTTTTTTGACGCTGGAGTTCACGTTCCCTCAATAGTGGA  
 CTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTTGATTTATAAGGGATT  
 TTTCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAC  
 AAAATATTAACGTTTATAATTTAGGTGGCATCTTTCCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGT  
 TTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAA  
 TAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTGCG  
 GCATTTTGCCTTCTGTTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAG  
 TTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAATAGTGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGC  
 CCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGT  
 ATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTAC  
 TCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATA  
 ACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACC  
 GCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAA  
 GCCATAACCAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGTAATGGTAACAACGTTGCGCAAACCTA  
 TTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAA  
 GTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCC  
 GGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTA  
 GTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGT  
 GCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTA  
 AAACCTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAATC  
 CCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGA  
 GATCCTTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTT  
 TGTTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGACAGAGCGCAGATA  
 CCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCT  
 ACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACC  
 GGGTTGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGC

ES 2 697 249 T3

ACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAA  
AGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGA  
GAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCAC  
CTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGC  
AACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGCGGTTTTGCTCACATGTTCTTTTCTGCGTTA  
TCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGA  
ACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG

>pAAV.CMV.premiR211 SEQ ID NO: 11

La secuencia subrayada es la secuencia del pre-miR211

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACA  
GGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG  
CACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT  
TTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAATTAAGGCTGCGCGCTCGCTCGCT  
CACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGA  
GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCTTGTAGTTAATGATTAACCC  
GCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGATCGGAATTCGCCCTTAAGCTAGCTAGTT  
ATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAAC  
TTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGT  
ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTAT  
TTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGAC  
GTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCCTACT  
TGCCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAAT  
GGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGT  
TTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGTAACAACCTCCGCCCATTGACGCAA  
ATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGATC  
CTGCAGAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGA  
CCAATAGAAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCT  
TACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCAGGCGGCCGCTCTGACCATGCAATCACA  
GGTGTGGGGGCATCCACTAGAGTGTGGTCAACCTATCAGGGCCGCACACTTAAAAAAAAAACTGA  
CTCCCTTCCCACAGAAGGGAATTTGTCAACTCCTCCCCACCCTCATGCTGGAATACTGACCGGCTT  
GATCCTGTGCAGCCAGCCACACTGTGAGTTCATGAGTGCGGAGGTCCTAAGAATCAGATCTTGGTG  
GATAAATCAGTTTGAATTTAGTGTTTTTGGACTTGTAATTTCTGCTTGGACCTGTGACCTGTGGGCT  
TCCCTTTGTCATCCTTTGCCTAGGCCTCTGAGTGAGGCAAGGACAGCAAAGGGGGGCTCAGTGGTC  
ACCTCTACTGCAGAGAGTTCAGAAGCCTAGCCTGAGCCAAGAGCAAGTTCTTCTCTGCTTCTGGAA  
ATGAAGTCGCCATGATCCTGACGATGTAAAAATCCCAAGCACGCTTGGATGGAAATCTCAGAGACA  
GACGATGCCACCCTGATCCATTGGATCCAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGAC  
TGGTATTCTTAACCTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCA  
TGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCAATTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTA  
TGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGGCTGACGCAACCC  
CACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTGCTTTCCCCCTCCCTAT  
TGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCAC  
TGACAATCCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCAC  
CTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTC  
CCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTCCGCGTCTTCGAGATCTGCCTCGACTGTGCCTTCT

ES 2 697 249 T3

AGTTGCCAGCCATCTGTTGTTT GCCCCTCCCCGTCGCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC  
ACTGTCCTTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG  
GGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGAC  
TCGAGTTAAGGGCGAATTCCCGATTAGGATCTTCCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGG  
CGGGTTAATCATTAAC TACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG  
CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT  
GAGCGAGCGAGCGCGCAGCCTTAATTAACCTAATTCACTGGCCGTGCTTTTACAACGTGCTGACTG  
GGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTGCCAGCTGGCGTAA  
TAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGC  
GCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGC  
CAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTGCGCCGGCTTTCC  
CCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCC  
CAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCCGATAGACGGTTTTTTCGCC  
TTTGACGCTGGAGTTCACGTTCCCTCAATAGTGGACTCTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCC  
TATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTTCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGA  
GCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTATAATTTACAGGTGGCAT  
CTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCC  
GCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCA  
ACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCATTTCCTTCTGTTTTTTCCTCACCCAGA  
AACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGA  
TCTCAATAGTGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTT  
TAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCG  
CATACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGG  
CATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACT  
TCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC  
TCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAAACGACGAGCGTGACACCACGAT  
GCCTGTAGTAATGGTAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCCG  
GCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTTCC  
GGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATGTCAGC  
ACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTAT  
GGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGA  
CCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGT  
GAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTC  
AGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTT  
GCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTT  
TCCGAAGGTAACCTGGCTTACAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTT  
AGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGT  
GGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA  
GGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACAC  
CGAACTGAGATACTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGA  
CAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGC  
CTGGTATCTTTATAGTCTTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTC  
GTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTTG  
CTGCGGTTTTTGTCTACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGC  
CTTTGAGTGAGCTGATAACCGCTCGCCGACCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGA  
AGCGGAAG

pAAV.RHO. premiR204 SEQ ID NO: 12

La secuencia subrayada es la secuencia del pre-miR204

La secuencia en negrita es la secuencia del promotor RHO humano

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACA  
 GTTTTCCCAGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG  
 CACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT  
 TTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAATTAAGGCTGCGCGCTCGCTCGCT  
 CACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGA  
 GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCCCTGTAGTTAATGATTAACCC  
 GCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGATCGGAATTCGCCCTTAAGCTAG**CAGATC**  
**TTCCCCACCTAGCCACCTGGCAAACCTGCTCCTTCTCTCAAAGGCCAAACATGGCCTCCCAGACTG**  
**CAACCCCCAGGCAGTCAGGCCCTGTCTCCACAACCTCACAGCCACCCTGGACGGAATCTGCTTCTT**  
**CCCACATTTGAGTCCTCCTCAGCCCCTGAGCTCCTCTGGGCAGGGCTGTTTTCTTTC**  
**CATCTTTGTATTCCCAGGGGCTGCAAATAAATGTTTAATGAACGAACAAGAGAGTGAATTCCAAT**  
**TCCATGCAACAAGGATTGGGCTCCTGGGCCCTAGGCTATGTGTCTGGCACCAGAAACGGAAGCTGC**  
**AGGTTGCAGCCCCTGCCCTCATGGAGCTCCTCCTGTGAGAGGAGTGTGGGGACTGGATGACTCCAG**  
**AGGTAACTTGTGGGGGAACGAACAGGTAAGGGGCTGTGTGACGAGATGAGAGACTGGGAGAATAAA**  
**CCAGAAAGTCTCTAGCTGTCCAGAGGACATAGCACAGAGGCCCATGGTCCCTATTTCAAACCCAGG**  
**CCACCAGACTGAGCTGGGACCTTGGGACAGACAAGTCATGCAGAAGTTAGGGGACCTTCTCCTCCC**  
**TTTTCTGGATCCTGAGTACCTCTCCTCCCTGACCTCAGGCTTCTCCTAGTGTACCTTGGCCCC**  
**TCTTAGAAGCCAATTAGGCCCTCAGTTTCTGCAGCGGGGATTAATATGATTATGAACACCCCAAT**  
**CTCCCAGATGCTGATTAGCCAGGAGCTTAGGAGGGGGAGGTCACTTTATAAGGGTCTGGGGGGGT**  
**CAGAACCAGAGTCATCC**GCCTGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCG  
 CTGTTCAGGACTTGGCTAAGCATTGCTTTGAACAAAATATCAAACAAGGACTCAAGGGGCAGAGAA  
 TGCTGGTCAGTGGCTAAGATGCCGGAGAATCAAGATGAGCAGGAAATGAAGAGGTTGGCTAAGAGG  
 GGCAGAGGAGGCAGGCGGAGGAGCTCCTGACCGTGTACCATGGCTACAGTCCCTTCTTCATGTGACT  
 CGTGGACTTCCCTTTGTATCCTATGCCTGAGAATATATGAAGGAGGCTGGGAAGGCAAGGGACG  
 TTCAATTGTCATCACTGGCATCTTTTTTGTATCATTACACCATCATCAAAGCATTGGATAACCAT  
 AACATGAAAATTACCATCATTGAGCCATAACTTTCCCTAAGACAAGGGTGACAATTTGAAACATCA  
 AAGAACCCTTACCAGGGAATTCAAGAAGTGAGAAGAGTGAATCAGATTCTCCCAGATTAACAACCC  
 CATGTTGGATCCAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACAT  
 GTTGTCTCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGT  
 ATGGCTTTCATTTCTCCTCCTTGATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGA  
 GTTGTGGCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGCTGACGCAACCCCCACTGG  
 TTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTCCGGGACTTTCGCTTCCCCCTCCCTATTGCCAC  
 GCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAA  
 TTCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGAT  
 TCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTCCCGCGG  
 CCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTCCGCGTCTTCGAGATCTGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGC  
 CAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTC  
 CTTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGT  
 GGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGACTCGAGT  
 TAAGGGCGAATTCCCATTAGGATCTTCCCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGC  
 ATGGCGGGTTAATCATTAACATAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCG  
 CTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCT  
 CAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCCTTAATTAACCTAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTG  
 ACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGC

GTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGG  
 ACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACAC  
 TTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCT  
 TTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCG  
 ACCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCCGATAGACGGTTTTTC  
 GCCCTTGACGCTGGAGTTCACGTTCCCTCAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGA  
 ACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTTCCGATTTCCGGCCTAT  
 TGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATTTAACGTTTATA  
 ATTTACAGGTGGCATCTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACAT  
 TCAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAG  
 AGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCCTCCTGTT  
 TTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGT  
 TACATCGAACTGGATCTCAATAGTGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGTTTTCCA  
 ATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAG  
 CAACTCGGTGCGCGCATACTACTTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACAGTCCAGAAAAG  
 CATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAG  
 TGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTT  
 GCACAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACC  
 AAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGTAATGGTAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGG  
 CGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAGG  
 ACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCG  
 TGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTA  
 CACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACT  
 GATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCA  
 TTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTAACG  
 TGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTT  
 GAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGG  
 TTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGACAGAGCGCAGA  
 TACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGC  
 CTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTA  
 CCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGGCTGAACGGGGGGTTCTGT  
 GCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAG  
 AAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAG  
 GAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCGGTTTCGCC  
 ACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCA  
 GCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTGCTGCGGTTTTGCTCACATGTTT  
 TTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCT  
 CGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG

pAAV.RHO.premiR211 SEQ ID NO: 13

La secuencia subrayada es la secuencia del pre-miR211

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACA  
 GGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG  
 CACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT  
 TTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAATTAAGGCTGCGCGCTCGCTCGCT

CACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGGTTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGA  
 GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTCCCTGTAGTTAATGATTAACCC  
 GCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGATCGGAATTCGCCCTTAAGCTAGCAGATC  
 TTCCCCACCTAGCCACCTGGCAAACCTGCTCCTTCTCTCAAAGGCCCAAACATGGCCTCCCAGACTG  
 CAACCCCCAGGCAGTCAGGCCCTGTCTCCACAACCTCACAGCCACCCTGGACCGGAATCTGCTTCTT  
 CCCACATTTGAGTCCCTCAGCCCCCTGAGCTCCTCTGGGCAGGGCTGTTTCTTTCCATCTTTGTA  
 TTCCCAGGGGCTGCAAATAAATGTTTAATGAACGAACAAGAGAGTGAATTCCAATTCCATGCAAC  
 AAGGATTGGGCTCCTGGGCCCTAGGCTATGTGTCTGGCACCAGAAACGGAAGCTGCAGGTTGCAGC  
 CCCTGCCCTCATGGAGCTCCTCCTGTGACAGGAGTGTGGGGACTGGATGACTCCAGAGGTAACCTG  
 TGGGGGAACGAACAGGTAAGGGGCTGTGTGACGAGATGAGAGACTGGGAGAATAAACAGAAAGTC  
 TCTAGCTGTCCAGAGGACATAGCACAGAGGCCCATGGTCCCTATTTCAAACCCAGGCCACCAGACT  
 GAGCTGGGACCTTGGGACAGACAAGTCATGCAGAAGTTAGGGGACCTTCTCCTCCCTTTTCCTGGA  
 TCCTGAGTACCTCTCCTCCCTGACCTCAGGCTTCCCTCCTAGTGTACCTTGGCCCCCTCTTAGAAGC  
 CAATTAGGCCCTCAGTTTCTGCAGCGGGGATTAATATGATTATGAACACCCCCAATCTCCAGATG  
 CTGATTCAGCCAGGAGCTTAGGAGGGGGAGGTCACTTTATAAGGGTCTGGGGGGGTGAGAACCAG  
 AGTCATCCGCCTGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCTGACCATGCAATCACAGG  
TGTGGGGGCATCCACTAGAGTGTGGTCAACCTATCAGGGCCGCACACTTAAAAAAAAAAAACTGACT  
CCCTTCCCACAGAAGGGAATTTGTCAACTCCTCCCCACCCTCATGCTGGAATACTGACCGGCTTGA  
TCCTGTGCAGCCAGCCACACTGTGAGTTCATGAGTGCAGGAGGTCCTAAGAATCAGATCTTGGTGG  
TAAATCAGTTTGATTTAGTGTTTTTGGACTTGTAATTTCTGCTTGGACCTGTGACCTGTGGGCTTC  
CCTTTGTCATCCTTTGCCTAGGCCTCTGAGTGAAGCAAGGACAGCAAAGGGGGGCTCAGTGGTCAC  
CTCTACTGCAGAGAGTTCAGAAGCCTAGCCTGAGCCAAGAGCAAGTTCTTCTCTGCTTCTGGAAAT  
GAAGTCGCCATGATCCTGACGATGTAAAAATCCCAAGCACGCTTGGATGGAAATCTCAGAGACAGA  
CGATGCCACCCTGATCCATTGGATCCAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTG  
GTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATG  
CTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGATAAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATG  
AGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCA  
CTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTG  
CCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTG  
ACAATTCGCTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCT  
GGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTCCC  
GCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCGTCTTCGAGATCTGCCTCGACTGTGCCTTCTAG  
TTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC  
TGTCCTTTCCCTAATAAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGG  
GGGTGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGACTC  
GAGTTAAGGGCGAATTCCTGATTAGGATCTTCCCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCG  
GGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCT  
CGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCGGGGCGGCTCAGTGA  
GCGAGCGAGCGCGCAGCCTTAATTAACCTAATTAACCTGAGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGG  
AAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCCGCCAGCTGGCGTAATA  
GCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGC  
CCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGCTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCA  
GCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCC  
GTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCA  
AAAACTTGATTAGGGTGTGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCCGATAGACGGTTTTTTTCGCCCTT  
TGACGCTGGAGTTCACGTTCCCTCAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCCTA  
TCTCGGTCTATTCTTTTATTATAAGGGATTTTTCCGATTTCCGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGC  
TGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTATAATTTACAGGTGGCATCT

TTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGC  
 TCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAAC  
 ATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGCATTTTTGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAA  
 CGCTGGTCAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATC  
 TCAATAGTGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTA  
 AAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGA  
 TACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCA  
 TGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACAATGCGGCCAACTTACTTC  
 TGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTC  
 GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGC  
 CTGTAGTAATGGTAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCC  
 AACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGG  
 CTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCAC  
 TGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGG  
 ATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACC  
 AAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGA  
 AGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAG  
 ACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGC  
 AAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGC CGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTC  
 CGAAGGTAACCTGGCTTACAGCAGAGCGCAGATAACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAG  
 GCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGG  
 CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG  
 CGCAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGA  
 ACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAG  
 GTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTG  
 GTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTC  
 AGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGGGCCTTTTTACGGTTCCCTGGCCTTTTTGCTG  
 CGGTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTT  
 TGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGC  
 GGAAG

pAAV.RHO.EGFP SEQ ID N°: 14

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCAGCACA  
 GGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG  
 CACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT  
 TTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAATTAAGGCTGCGCGCTCGCTCGCT  
 CACTGAGGCCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTTCGGGCGACCTTTGGTTCGCCCGCCTCAGTGAGCGA  
 GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCAC TAGGGTTCCCTGTAGTTAATGATTAACCC  
 GCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGATCGGAATTCGCCCTTAAGCTAGCAGATC  
 TTCCCCACCTAGCCACCTGGCAAACCTGCTCCTTCTCTCAAAGGCCCAAACATGGCCTCCCAGACTG  
 CAACCCCGAGGAGTCAAGCCCTGTCTCCACAACCTCACAGCCACCCTGGACGGAATCTGCTTCTT  
 CCCACATTTGAGTCTCTCAGCCCTGAGTCTCTTGGGCGAGGCTGTTTTCTTTC  
 CATCTTTGTATTCCCAGGGGCTGCAAATAAATGTTTAATGAACGAACAAGAGAGTGAATTCCAAT  
 TCCATGCAACAAGGATTGGGCTCCTGGGCCCTAGGCTATGTGTCTGGCACCAGAAACGGAAGCTGC  
 AGGTTGCAGCCCCTGCCCTCATGGAGCTCCTCCTGTGAGAGGAGTGTGGGGACTGGATGACTCCAG  
 AGGTAACCTGTGGGGGAACGAACAGGTAAGGGGCTGTGTGACGAGATGAGAGACTGGGAGAATAAA

CCAGAAAGTCTCTAGCTGTCCAGAGGACATAGCACAGAGGCCCATGGTCCCTATTTCAAACCCAGG  
 CCACCAGACTGAGCTGGGACCTTGGGACAGACAAGTCATGCAGAAGTTAGGGGACCTTCTCCTCCC  
 TTTTCCTGGATCCTGAGTACCTCTCCTCCCTGACCTCAGGCTTCCTCCTAGTGTACCTTGGCCCC  
 TCTTAGAAGCCAATTAGGCCCTCAGTTTCTGCAGCGGGGATTAATATGATTATGAACACCCCCAAT  
 CTCCCAGATGCTGATTACAGCCAGGAGCTTAGGAGGGGGAGGTCACCTTTATAAGGGTCTGGGGGGGT  
 CAGAACCCAGAGTCATCCGCCTGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGC  
 CATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGA  
 CGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGAC  
 CCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGAC  
 CTACGGCGTGCAGTGCTTACGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGC  
 CATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCG  
 CGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAA  
 GGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCAT  
 GGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAG  
 CGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGGCAGCGCCCCGTGCTGCTGCCCGA  
 CAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCG  
 ATCACATGGTCCCTGCTGGAGTTCGTGACCCGCCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACA  
 AGTAATAAGCTTGGATCCAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTT  
 AACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCT  
 TCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTG  
 TGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGG  
 GGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCG  
 GAACTCATCGCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCC  
 GTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTCCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTG  
 CGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCCGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGCGGCTG  
 CTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGAGATCTGCCTCGACTGTGCCTTCT  
 AGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC  
 ACTGTCCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG  
 GGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGAC  
 TCGAGTTAAGGGCGAATTTCCGATTAGGATCTTCCCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGG  
 CGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCG  
 CTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGT  
 GAGCGAGCGAGCGCGCAGCCTTAATTAACCTAATTCACTGGCCGTCGTTTTTACAACGTCGTGACTG  
 GGAAAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTGCCAGCTGGCGTAA  
 TAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGC  
 GCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCG  
 CTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTCCG  
 CCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGC  
 ACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGTTTACGTTACGTTAGTGGCCATCGCCCCGATAGACGG  
 TTTTTCGCCCTTTGACGCTGGAGTTCACGTTCCCTCAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACCTGGAACAA  
 CACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGTATTTATAAGGGATTTTTCCGATTTCCGGCCTATTGGT  
 TAAAAAATGAGCTGATTTAACAATAAATTTAACGCGAATTTTAAACAATAATTAACGTTTATAATTT  
 CAGGTGGCATCTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAA  
 ATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTA  
 TGAGTATCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCCCTGTTTTTGG  
 CTCACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGA  
 GTGGGTACATCGAAGTGGATCTCAATAGTGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAACGT  
 TTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCGTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGG

CAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACA  
 GAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGAT  
 AACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAC  
 AACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAAC  
 GACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGTAATGGTAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAA  
 CTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCA  
 CTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGG  
 TCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGT  
 TATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGC  
 CTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAA  
 ACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCC  
 TTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGA  
 TCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCCGCTACCAGCGGTGGTTTG  
 TTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACC  
 AAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC  
 ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGG  
 GTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGGTGAACGGGGGGTTCGTGCAC  
 ACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGC  
 TATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTGC  
 GAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCTTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGT  
 TTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAA  
 ACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTTCTGGCCTTTTGTGCTGCGGTTTTGCTCACATGTTCTTTC  
 CTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCC  
 GCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG

pAAV2.1 CMV hAIPL1(promotor de CMV en **negrita**; compuestos hAIPLI doble subrayado) SEQ ID NO: 15

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGCACA  
 GGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG  
 CACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT  
 TTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAATTAAGGCTGCGCGCTCGCTCGCT  
 CACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGCAGCCTTTGGTCCGCCCGCCTCAGTGAGCGA  
 GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGTTTCTTGTAGTTAATGATTAACCC  
 GCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGATCGGAATTCGCCCTTAAGCTAGCTAGT**T**  
**ATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAAC**  
**TTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGT**  
**ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAA**  
**CTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG**  
**GTAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA**  
**TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGAT**  
**AGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTTTGGC**  
**ACCAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTA**  
**GGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGATCCTGCAGAAGT**  
 TGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAA  
 CTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCCTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATC  
 CACTTTGCCCTTCTCTCCACAGGTGTCCAGGCGGCCCGCCATGGATGCCGCTCTGCTCCTGAACGTG  
GAAGGGGTCAAGAAAACCATTCTGCACGGGGGCACGGGCGAGCTCCCAAACCTTCATCACCGGATCC  
CGAGTGATCTTTTCAATTTCCGCACCATGAAATGTGATGAGGAGCGGACAGTCATTGACGACAGTCGG  
CAGGTGGGCCAGCCATGCACATCATCATCGGAAACATGTTCAAGCTCGAGGTCTGGGAGATCCTG

CTTACCTCCATGCGGGTGCACGAGGTGGCCGAGTTCTGGTGCACACCATCCACACGGGGGTCTAC  
CCCATCCTATCCCGGAGCCTGAGGCAGATGGCCCAGGGCAAGGACCCCACAGAGTGGCACGTGCAC  
ACGTGCGGGCTGGCCAACATGTTTCGCTACCACACGCTGGGCTACGAGGACCTGGACGAGCTGCAG  
AAGGAGCCTCAGCCTCTGGTCTTTGTGATCGAGCTGCTGCAGGTTGATGCCCCGAGTGATTACCAG  
AGGGAGACCTGGAACCTGAGCAATCATGAGAAGATGAAGGCGGTGCCCGTCTCCACGGAGAGGGA  
AATCGGCTCTTCAAGCTGGGCCGCTACGAGGAGGCTCTTCCAAGTACCAGGAGGCCATCATCTGC  
CTAAGGAACCTGCAGACCAAGGAGAAGCCATGGGAGGTGCAGTGGCTGAAGCTGGAGAAGATGATC  
AATACTCTGATCCTCAACTACTGCCAGTGCCTGCTGAAGAAGGAGGAGTACTATGAGGTGCTGGAG  
CACACCAGTGATATTCTCCGGCACCACCCAGGCATCGTGAAGGCCTACTACGTGCGTGCCCCGGCT  
CACGCAGAGGTGTGGAATGAGGCCGAGGCCAAGGCGGACCTCCAGAAAGTGCTGGAGCTGGAGCCG  
TCCATGCAGAAGGCGGTGCGCAGGGAGCTGAGGCTGCTGGAGAACC GCATGGCGGAGAAGCAGGAG  
GAGGAGCGGCTGCGCTGCCGGAACATGCTGAGCCAGGGTGCCACGCAGCCTCCCGCAGAGCCACCC  
ACAGAGCCACCCGCACAGTCATCCACAGAGCCACCTGCAGAGCCACCCACTGACCATCTGCAGAGC  
TGTCCGCAGGGCCCCCTGCAGAGCCAGCCACAGAGCCACCCCGTCCCCAGGGCACTCGCTGCAGC  
ACTGAAAGCTTGATCCAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTA  
ACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTT  
CCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGT  
GGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGACTGTGTTTGTGACGCAACCCCCACTGGTTGGG  
GCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGG  
AACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCG  
TGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGC  
GCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCTTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTTCCCGCGGCCTGC  
TGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGAGATCTGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC  
ATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTT  
CTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGT  
GGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGACTCGAGTTAAGG  
GCGAATTCCCGATTAGGATCTTCCCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCA  
TTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGGCTCGCTCGCTCACTG  
AGGCCGGGCGACCAAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG  
CGCGCAGCCTTAATTAACCTAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTG  
GCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG  
CCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCG  
GCGCATTAAAGCGCGGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAG  
CGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCCGTCAAGCTC  
TAAATCGGGGGCTCCCTTAGGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTG  
ATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCCGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGCTGG  
AGTTCACGTTCTCAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCT  
ATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTTCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAAC  
AAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTATAATTTTCAGGTGGCATCTTTCGGGGAA  
ATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGAC  
AATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTG  
TCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCATTTTGCCTTCCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGA  
AAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAATAGTG  
GTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGC  
TATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACTACTATT  
CTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA  
GAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGA  
TCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTTCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATC

GTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGTAA  
 TGGTAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCAGCAACAATTA  
 TAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGT  
 TTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAG  
 ATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAA  
 ATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCTGTCAGACCAAGTTTACT  
 CATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTT  
 TTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAG  
 AAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAA  
 AACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAA  
 CTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCT  
 TCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCA  
 GTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGT  
 CGGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGAT  
 ACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGG  
 TAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTT  
 ATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGC  
 GGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGCCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGCGGTTTTG  
 CTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAG  
 CTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG

pAAV2.1 CMV-eGFP (promotor de CMV en **negrita**; compuestos EGFP verdes) SEQ ID NO: 16

AGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCAGACA  
 GGTTTCCCAGCTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG  
 CACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAAT  
 TTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAATTAAGGCTGCGCGCTCGCTCGCT  
 CACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTGGGGCAGCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGA  
 GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCAC TAGGGTTCCCTGTAGTTAATGATTAACCC  
 GCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAGATCGGAATTCGCCCTTAAGCTAGCT**TAGTT**  
**ATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAAC**  
**TTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGT**  
**ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAA**  
**CTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACG**  
**GTAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACA**  
**TCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGAT**  
**AGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGC**  
**ACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTA**  
**GGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGATC**CTGCAGAAGT  
TGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAA  
CTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCCTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATC  
CACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCAGGCGGCCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTT  
ACGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCC  
GGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAG  
CTGCCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGACGTGCTTCAGCCGCTAC  
CCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC  
ACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACC

CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAG  
CTGGAGTACAAC TACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG  
GTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAG  
AACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC  
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGG  
ATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAATAAGCTTGGATCCAATCAACCTCTGGATTACAA  
 AATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGC  
 TTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCCTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATC  
 CTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTGTGCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGT  
 GTTTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTT  
 CGCTTTCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGGCCGCTGCTGGACAGG  
 GGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCCTTTCCCTGGCT  
 GCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAA  
 TCCAGCGGACCTTCCCTCCCGCGGCCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGAGATCT  
 GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACC  
 CTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATGTCATCGCATTGTCTGAGT  
 AGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAAT  
 AGCAGGCATGCTGGGGACTCGAGTTAAGGGCGAATTCCCATTAGGATCTTCTAGAGCATGGCTA  
 CGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAAC TACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCAC  
 TCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCCGGGCTT  
 TGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCAGCCTTAATTAACCTAATTACTGGCCGTCGT  
 TTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCC  
 TTTCCGCGAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCT  
 GAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAG  
 CGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCCGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGC  
 CACGTTCCGCCGGCTTTCCCGCTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGC  
 TTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGTGATGGTTACGTAAGTGGGCCATCGCCCCG  
 ATAGACGGTTTTTTCCGCCCTTTGACGCTGGAGTTCACGTTCCCTCAATAGTGGACTCTTGTTCAAAC  
 TGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTATAAGGGATTTTTCCGATTTCCGC  
 CTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTT  
 TATAATTTAGAGTGGCATCTTTCCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAAT  
 ACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAG  
 GAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCTTCC  
 TGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGT  
 GGGTTACATCGAACTGGATCTCAATAGTGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCCGCCCGAAGAACGTTT  
 TCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCA  
 AGAGCAACTCGGTCCCGCATACTACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTACAGAA  
 AAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAA  
 CACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGACAA  
 CATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACAAACGA  
 CGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGTAATGGTAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGA  
 ACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACT  
 TCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGGAGCGTGGGTC  
 TCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGAC  
 GGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAA  
 GCATTGGTAACGTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACCTTCAATTTTA  
 ATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTT  
 TTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCT

GCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCA  
 AGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTCT  
 TCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCT  
 GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAG  
 ACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGGCTGAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCCAGCTT  
 GGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCC  
 CGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA  
 GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCGTGTCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCG  
 TCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTT  
 ACGGTTCCGTCCTTTTTGCTGCGGTTTTGCTCACATGTTCTTTCCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGT  
 GGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAG  
 CGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG

#### Construcción de plásmidos

Los vectores de AAV recombinantes que contienen la secuencia precursora murina de miR-204 y miR-211 bajo el promotor de citomegalovirus (CMV) se construyeron mediante un protocolo de clonación de dos pasos. Inicialmente, los casetes que contenían el precursor de miR-204 y miR-211 se amplificaron a partir del ADN genómico de ratón utilizando los siguientes dos conjuntos de oligonucleótidos: 5'- ATAAGAATGCGGCCGCTGTTTCAGGACTTGGCTAAG-3' (SEQ ID NO: 17) y 5'- CGCGGATCCAACATGGGGTTGTTAATCTG-3' (SEQ ID NO: 18) para miR-204; 5'- ATAAGAATGCGGCCGCTGACCATGCAATCACAG-3' (SEQ ID NO: 19) y 5'- CGCGGATCCAATGGATCAGGGTGGCATC-3' (SEQ ID NO: 20) para miR-211. Los amplímeros obtenidos se subclonaron en el vector de clonación TA® de TOPO® (Invitrogen) y se liberaron después de la digestión con Not I y BamH I. El fragmento se clonó luego en los sitios Not I - BamH I del plásmido pAAV2.1-CMV-EGFP (25) y se utilizó para la producción de vectores AAV2/8.

El vector en el que la expresión del precursor miR-204 está bajo el control de un promotor específico del fotorreceptor (pAAV.RHO.premiR-204) se generó al intercambiar el promotor CMV de pAAV.CMV.premiR204 con la secuencia del promotor de rodopsina (RHO). Brevemente, la secuencia correspondiente al promotor de la rodopsina humana se liberó del plásmido pAAV2.1-RHO-EGFP (25) por restricción con Nhe I y Not I y se clonó en la estructura de pAAV.CMV.premiR204, previamente digerido con las mismas enzimas.

Para generar los vectores que expresaban hAIPLI (pAAV2.1-CMV-hAIPLI), la secuencia de codificación del gen hAIPLI se amplificó a partir de ADNc de retina humana (BioChain, Hayward, CA) usando los cebadores hAIPLI-NotI-directo (5'-ATATGCGGCCGCCATGGATGCCGCTCTGCTCCT-3') SEQ ID NO: 21 y hAIPLI-HindIII-inverso (5'-ACGCGTAAGCTTTTATCAGTGCTGCAGCGAGTGCC-3') SEQ ID NO: 22 y se clonaron en el pAAV2.1-CMV-EGFP después de la digestión con Not I y Hind III.

#### Producción del virus AAV

Los virus AAV2/8 recombinantes fueron producidos por el núcleo de inyección TIGEM AAV de acuerdo con los protocolos descritos en otra parte (26). Para cada preparación viral, los títulos físicos [copias del genoma por mililitro (GC/ml)] se determinaron mediante cuantificación por PCR utilizando Taqman (27).

#### Procedimientos con animales

Todos los estudios en ratones se realizaron en estricta conformidad con las directrices institucionales para la investigación con animales y con la Declaración de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) para el uso de animales en la investigación oftalmológica y de la visión. Toda la cirugía se realizó bajo anestesia y se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento.

Se anestesiaron ratones postnatales por hipotermia durante 2 minutos a 4°C y se inyectaron subretinalmente en las áreas de la retina dorsal con 1 µl de vectores de AAV correspondientes a 1x10<sup>9</sup> copias de genoma (GC). El mismo individuo realizó todos los procedimientos quirúrgicos para minimizar la variabilidad en la técnica de inyección. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

Ratones adultos (se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de avertina (1,25% p/v de 2,2,2-tribromoetanol y 2,5% v/v de 2-metil-2-butanol; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) a 2 ml/100 g de peso corporal, y los vectores virales se administraron a través de un abordaje transcoroidal transescleral, como se describió anteriormente (28). Los ratones se inyectaron en un ojo con 1 µl de una mezcla compuesta de 9:1 v/v AAV.CMV.premiR204/211 y AAV.CMV.EGF. El ojo contralateral se inyectó con 1 µl de AAV.CMV.EGFP y sirvió como control. Después de la inyección (17-30 días después), se evaluó la extensión de la transducción mediante oftalmoscopia y se recogieron los ojos.

#### Microdissección de captura láser

Las secciones retinales congeladas en cortes de membrana PEN se microdisseccionaron utilizando un microscopio

LMD 6500. Las rodajas se fijaron durante 2 minutos en etanol (EtOH) al 75% enfriado previamente en agua DEPC, luego se lavaron dos veces en agua DEPC durante 30 segundos y se tiñeron en hematoxilina de Meyer 7  $\mu\text{M}$  durante 1 minuto. Después de la tinción de hematoxilina del núcleo, las rodajas se lavaron dos veces en agua DEPC durante 30 segundos y se deshidrataron en EtOH 70%, EtOH 80%, EtOH 90%, dos veces EtOH 100% (30 segundos cada una) y se secaron al aire durante 15 minutos. Los parámetros del láser utilizados para la microdissección fueron: Potencia 60, Apertura 7, Velocidad 7, Balance de la muestra 46 y Desplazamiento 25.

#### Análisis de la expresión del miARN

El análisis de la expresión del miARN en ratones administrados con las construcciones AAV.CMV.EGFP y AAV.CMV.premiR204/211 se realizó en muestras de retinas completas y copas ópticas, respectivamente. El total del ARN se extrajo utilizando el kit miRNeasy (Qiagen, Inc., Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cuantificó utilizando el NanoDrop 1000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA). La calidad del ARN se evaluó mediante electroforesis en gel. La detección cuantitativa (q) de la transcriptasa inversa (RT-) basada en PCR de miR-204, miR-124a y sno234 maduros se realizó utilizando los ensayos de microARN TaqMan® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados de qRT-PCR, registrados como números de ciclo de umbral (Ct), se normalizaron frente al ARN pequeño de referencia sno234 y el número de cambios relativos de expresión se calculó utilizando el método  $2^{-\text{ddCT}}$ .

#### Electrorretinografía

Para los registros electrofisiológicos, los ratones se adaptaron a la oscuridad durante 3 horas, se acomodaron en un aparato estereotáxico bajo luz roja tenue, sus pupilas se dilataron con una gota de tropicamida al 1% (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) y se mantuvo la temperatura corporal a 37,5°C. Los ERGs fueron provocados por destellos de 10 ms de diferentes intensidades de luz que van desde  $10^{-4}$  a 20  $\text{cd.s/m}^2$  generados a través de un estimulador de Ganzfeld (CSO, Florencia, Italia). Para minimizar el ruido, se promediaron tres respuestas diferentes provocadas por la luz para cada paso de luminancia (el intervalo de tiempo entre los estímulos de luz fue de 4-5 min). Las señales electrofisiológicas se registraron con electrodos chapados en oro insertados debajo de los párpados inferiores en contacto con la córnea. Los electrodos en cada ojo fueron referidos a un electrodo de aguja insertado subcutáneamente al nivel de la región frontal correspondiente. Los diferentes electrodos se conectaron a un amplificador de dos canales. Las amplitudes de las ondas a y b se representaron en función del aumento de la intensidad de la luz. Una vez completadas las respuestas obtenidas en condiciones adaptadas a la oscuridad (escotópica), la sesión de grabación continuó con el objetivo de analizar la vía del cono que media la respuesta de la luz (fotópica). Para este fin, el ERG en respuesta a la luz de 20  $\text{cd.s/m}^2$  se registró en presencia de una luz de fondo continua (luz de fondo establecida en 50  $\text{cd/m}^2$ ). Para cada grupo, la amplitud media de la onda b se representó en función de la luminancia (curva de transferencia) en condiciones escotópicas y fotópicas.

#### Análisis histológico

Los ratones se sacrificaron y sus globos oculares se recogieron y se fijaron durante la noche mediante inmersión en paraformaldehído al 4% (PFA). Antes de recoger los globos oculares, el aspecto temporal de las escleras se marcó con cauterización para orientar los ojos con respecto al lugar de la inyección en el momento de la inclusión. Los ojos se infiltraron con 30% de sacarosa para la crioconservación y se incluyeron en medio de congelación de tejidos (matriz O.C.T., Kaltek, Padua, Italia) en pares (es decir, ojo izquierdo y derecho) para facilitar el análisis comparativo. Para cada ojo, se cortaron de 150 a 200 secciones en serie (10  $\mu\text{m}$  de espesor) a lo largo del plano horizontal y las secciones se distribuyeron progresivamente en 10 portaobjetos, de modo que cada portaobjeto contenía de 10 a 15 secciones, cada una representativa de todo el ojo en diferentes niveles. Las secciones se tiñeron con 4',6'-diamidino-2-fenilindol (Vectashield, Vector Lab Inc., Peterborough, Reino Unido) y EGFP se controló con un Zeiss Axiocam (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) con diferentes aumentos.

#### Tinción por inmunofluorescencia

Las secciones retinales congeladas se lavaron una vez con PBS y luego se fijaron durante 10 minutos en PFA al 4%. Luego se permeabilizaron las secciones durante 15 min en PBS que contenía NP-40 al 1% (para anti-rodopsina, arrestina anticonosa, anti-glutamina sintetasa) o en tampón de citrato (para la opsina anti-M y -S). Se aplicó una solución de bloqueo que contenía suero de cabra normal al 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) durante 1 hora. Los anticuerpos primarios se diluyeron en PBS y se incubaron durante la noche a 4°C. El anticuerpo secundario (Alexa Fluor® 594, anti-conejo o anti-ratón, 1:1000; Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA) se incubó durante 45 min. Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-hCAR (29), Opn1mw (AB5405; Millipore), Opn1sw (AB5407; Millipore), Rodopsina (Abcam) y anti-glutamina sintetasa (MAB302; Millipore). Se utilizó Vectashield (Vector Lab Inc., Peterborough, Reino Unido) para visualizar los núcleos. Las secciones se fotografiaron utilizando microscopía confocal Zeiss (LSM 710).

## Ensayo túnel

Los núcleos apoptóticos en las secciones retinianas congeladas se detectaron con el kit de marcado de níquel terminal dUTP mediado por TdT de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de detección de muerte celular in situ, TMR rojo; Roche).

## 5 Resultados

En este documento, los autores proponen usar dos miARN, a saber, miR-204 y miR-211, para proteger la retina de la degeneración neuronal. En este estudio, los autores decidieron determinar el efecto que la administración de miR-204/211 a las células de la retina tiene sobre la progresión de la neurodegeneración.

10 Con este objetivo, los autores decidieron administrar las formas precursoras de miR-204 (premiR-204) y de miR-211 (premiR-211) en la retina (es decir, en el espacio subretiniano) de modelos de ratones naturales o ratones de la degeneración retiniana. En particular, los autores utilizaron el siguiente esquema de inyección: cada ratón analizado fue inyectado en un ojo con un constructo viral asociado a adeno (AAV) que contenía la secuencia precursora de miR-204 o de miR-211 (consúltese la sección de Métodos para obtener más detalles). El ojo contralateral de cada animal se inyectó, usando la misma estrategia, con una construcción de AAV que contenía un casete del gen indicador (Proteína Fluorescente Verde Mejorada, EGFP) solo y sirvió como control experimental. Para estos experimentos, los autores decidieron usar el AAV serotipo 2/8, que se había demostrado previamente que transducía de manera efectiva la retina de los mamíferos, predominantemente el epitelio pigmentario de la retina y los fotorreceptores (19). Para impulsar la expresión de pre-miR-204/211 o EGFP en la retina inyectada, los autores utilizaron inicialmente el promotor del citomegalovirus constitutivo (CMV).

## 20 Evaluación del procesamiento adecuado de miARN y la sobreexpresión en fotorreceptores

Antes de llevar a cabo los experimentos en modelos de ratón de degeneración de fotorreceptores, los autores primero intentaron determinar si la administración mediada por AAV de las secuencias precursoras de miR-204 y miR-211 era seguida por el procesamiento adecuado de miARN y la formación de las formas maduras de miR-204 y miR-211 en las células fotorreceptoras transducidas. Para este fin, los autores inyectaron a tres ratones naturales el constructo viral AAV.CMV.premiR204 en un ojo y el constructo de control AAV.CMV.EGFP en el ojo contralateral. Luego, los autores realizaron la Microdissección de Captura Láser (LCM) de todos los ojos inyectados para recolectar específicamente la capa nuclear externa, que contiene las células fotorreceptoras (Figura 1A). Los autores extrajeron el ARN total de las muestras recolectadas y midieron los niveles de expresión de la forma madura de miR-204 mediante PCR cuantitativa (q) con transcriptasa inversa (RT) utilizando el kit de ensayo de microARN TaqMan. Los autores encontraron que la administración del vector AAV.CMV.premiR204 confirió un aumento de 1,5 a 2 veces de miR-204 maduro en comparación con los niveles endógenos (Figura 1B).

Estos resultados demuestran que la administración del vector AAV.CMV.premiR204 indujo un aumento en los niveles de miR-204 correctamente procesado. Con el fin de excluir que la administración y el procesamiento de los transgenes premiR-204 podían interferir con la maquinaria de procesamiento de miARN en la retina y, por lo tanto, afectar los niveles endógenos fisiológicos de otros miARN, los autores también midieron en ojos inyectados la expresión de un miARN no relacionado, miR-124, que se expresaba abundantemente en la retina (16). Los autores encontraron que los niveles de expresión de miR-124 no se modificaron significativamente en los fotorreceptores de los ojos inyectados (Figura 1B). Por lo tanto, los autores concluyeron que la administración mediada por AAV de premiR-204 conduce al procesamiento apropiado y a los niveles de expresión aumentados de las formas maduras de este miARN en fotorreceptores y no altera el procesamiento ni la expresión adecuadas de otros miARN expresados en la retina. Se obtuvieron resultados similares con la administración de premiR-211 mediado por AAV.

La administración de miR-204/211 mediada por AAV conduce a la mejora de la morfología de la retina y la función en modelos de ratón de degeneración de fotorreceptores

Para evaluar el efecto beneficioso de miR-204/211 en IRD, los autores utilizaron los siguientes dos modelos de ratón:

1) un modelo para una forma autosómica recesiva de IRD causada por una mutación nula homocigótica en la proteína que interactúa con hidrocarburos de Arilo como el gen 1 (Aip1l) (ratones knockout para Aip1l) (20). Las mutaciones en el gen AIP1 son responsables de una forma grave de LCA en seres humanos. En ratones Aip1l<sup>-/-</sup>, la retina se desarrolla normalmente hasta el día postnatal (P) 12. Después de esta etapa, los fotorreceptores de conos y bastones comienzan a degenerar rápidamente, lo que lleva a la desorganización, la fragmentación y la notable reducción de tamaño de los segmentos externos del fotorreceptor y del grosor de la ONL. La pérdida tanto de la función de los bastones como de los conos, debido a la deficiente fototransducción y la degeneración en proceso, se refleja en una ausencia completa de electroretinograma (ERG) en ratones Aip1l<sup>-/-</sup> (20, 21).

2) un modelo para una forma autosómica dominante de IRD (Ratón transgénico con rodopsina P347S). Esta línea de ratones transgénicos transporta una copia del gen de la rodopsina humana que alberga una sustitución de prolina por serina en la posición 347 de la proteína. Esta mutación es responsable de una forma de RP en pacientes humanos. El fenotipo retiniano en este modelo de ratón es menos grave en comparación con los ratones Aip1l<sup>-/-</sup> y

puede obtenerse una respuesta ERG, aunque severamente dañada, hasta 2-3 meses de vida postnatal (22).

Los autores encontraron que la administración del transgén premiR-204 conduce a una notable conservación de la estructura retiniana en los ojos inyectados de los modelos *Aipl1<sup>-/-</sup>* y Rodopsina P347S, en comparación con los ojos contralaterales inyectados con EGFP.

5 En particular, los autores obtuvieron los siguientes resultados:

a) Modelo *Aipl1<sup>-/-</sup>*.

10 Los autores inyectaron a ratones *Aipl1<sup>-/-</sup>* el día postnatal (P) 4 utilizando el esquema descrito anteriormente y sacrificaron los ratones en P21. En esta etapa, solo un bastón de núcleos de fotorreceptores está presente en los ojos inyectados con EGFP (Figura 2A). En contraste, los autores observaron un aumento significativo en el número de bastones preservados, así como en la densidad de los núcleos de los fotorreceptores en los ojos contralaterales de los animales anteriores, que se inyectaron con el constructo AAV.CMV.premiR204 (Figura 2B-C). Estos resultados demuestran claramente una progresión más lenta de la degeneración retiniana en los ojos inyectados con miR-204. Además, los autores observaron un aumento de la tinción para los marcadores de bastones (rodopsina) y de conos fotorreceptor (arrestina de cono y opsina M) en la ONL de ojos inyectados con el vector AAV.CMV.premiR204 en comparación con los ojos contralaterales inyectados con el vector de control, según lo evaluado por análisis de inmunofluorescencia (Figuras 3 y 4). Finalmente, la estructura del cono y los segmentos externos se conservaron mejor en los ojos inyectados con el vector miR-204, en comparación con los contralaterales, como se muestra mediante el inmunomarcaje con arrestina de los conos (Figuras 3C y 3D). Se obtuvieron resultados similares con la administración de premiR-211 mediado por AAV.

20 Para evaluar si el efecto protector que el miR-204/211 confería a la retina se podía explotar en combinación con los enfoques de reemplazo de genes, los autores llevaron a cabo el procedimiento de inyección descrito anteriormente (es decir, la inyección subretiniana en P4) en ratones *Aipl1<sup>-/-</sup>* que combinaban el vector AAV.CMV.premiR204 con un vector AAV que dirigía la expresión del cADN de AIPL1 humano bajo el control de CMV. Esta estrategia permitiría evaluar si la combinación de la neuroprotección retiniana (conferida por la administración de miR-204/211) y el reemplazo de la deficiencia del gen *Aipl1* (AIPL1 humano) podía tener un efecto terapéutico sinérgico. Como se muestra en la Figura 5, el análisis histológico retiniano en P30 demostró que la combinación de miR-204 y AIPL1 humano preservaba el grosor de la retina de manera más eficiente en comparación con el ojo contralateral inyectado con la AIPL1 humana sola. Estos datos preliminares sugieren que la combinación de la inyección de miR-204 y la administración del gen AIPL1 humano puede producir efectos terapéuticos aditivos, es decir, ralentizar la progresión de la degeneración de la retina (efecto miR-204) y aumentar la restauración potencial de la actividad de AIPL1 (suplementación del gen AIPL1 humano).

Se obtuvieron resultados similares con la administración de premiR-211 mediado por AAV.

b) Modelo de ratón rodopsina P347S.

35 Los autores inyectaron ratones transgénicos P347S en P4 siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para el ratón *Aipl1<sup>-/-</sup>* y sacrificaron a los animales en dos puntos temporales diferentes, es decir, P30 y P60. Primero, los autores detectaron en P30 una mejora notable de la respuesta de ERG en los ojos inyectados con miR-204 de ratones P347S, en comparación con los ojos inyectados con EGFP contralateral (Figura 6). Los autores encontraron que esta mejora también fue persistente en la P60, es decir, dos meses después de la inyección (Figura 7). En ambas etapas (es decir, P30 y P60), la respuesta ERG mejorada prevaleció en condiciones fotópicas que reflejan la actividad de los conos, lo que indica que los fotorreceptores de los conos representan la principal diana del efecto beneficioso proporcionado por la inyección de miR-204. De acuerdo con el hallazgo anterior, el análisis de inmunofluorescencia reveló una preservación significativa en la expresión de marcadores de fotorreceptores de conos, como *Opn1mw* (M-Opsina) y *Opn1sw* (S-Opsina), en los ojos inyectados con miR-204 en lugar de los ojos inyectados con EGFP (figura 8).

45 Como apoyo adicional de los resultados anteriores, los autores también encontraron que la inyección de las construcciones de premiR-204 AAV determinó una disminución estadísticamente significativa en el número de células apoptóticas en la capa de fotorreceptores en comparación con los ojos inyectados con EGFP, como lo revela la tinción TUNEL (Figura 9). Además, los autores determinaron que la inyección de miR-204 conducía a una reducción drástica de la gliosis retiniana, lo que representa una respuesta fisiológica al daño del fotorreceptor, según se evaluó mediante tinción de inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-glutamina sintetasa (anti-GS6) (Figura 10). Los autores ampliaron estas observaciones aumentando el número de retinas murinas analizadas y confirmaron los resultados (Figura 16).

55 En conjunto, estos hallazgos sugieren determinantemente que la administración subretiniana de los vectores miR-204/211 retarda la degeneración retiniana en P347S y preserva la función retiniana, particularmente en condiciones escotópicas y fotópicas.

Todos los experimentos de inyección descritos anteriormente se llevaron a cabo utilizando un constructo de AAV que contiene el promotor constitutivo de CMV, que impulsa la expresión transgénica en todas las células

transducidas. Para verificar si la expresión restringida de miR-204/211 en los fotorreceptores era suficiente para garantizar el efecto beneficioso de estos dos miARN en modelos IRD, los autores generaron un constructo de AAV en el que la expresión del precursor de miR-204 estaba bajo el control del promotor de la rodopsina que impulsa la expresión del transgén específicamente en los fotorreceptores (Allocca et al, J of Virology, 2007 y Mussolino et al, Gene Therapy 2011). Luego, los autores inyectaron un grupo de ratones transgénicos P347S con este constructo (AAV.RHO.premiR204) en P4 siguiendo la misma estrategia utilizada para el constructo AAV.CMV.premiR204. Los autores obtuvieron una mejora notable de la respuesta ERG en los ojos inyectados con RHO.miR204 en comparación con los controles inyectados con EGFP contralateral en P30 (Figura 11). Los autores ampliaron estas observaciones aumentando el número de retinas murinas analizadas y confirmaron los resultados (Figura 17). Similar a lo que se muestra para el uso del promotor CMV (Figura 14), también la inyección del constructo RHO.miR204 no produjo ninguna alteración significativa de la amplitud de las ondas 'b' en las retinas de los ojos inyectados con miR-204/211 en comparación con los ojos de los controles inyectados con EGFP contralateral de ratones naturales (Figura 17). Los datos anteriores demuestran claramente que la expresión restringida de los transgenes miR-204 en los fotorreceptores es suficiente para garantizar el papel protector de estos dos miARN en las condiciones de IRD in vivo.

Es importante señalar que todos los experimentos descritos anteriormente también se han realizado con las secuencias premiR-204 o premiR-211 cuya inyección produjo resultados muy similares en todos los modelos analizados (ver ejemplo en las Figuras 12 y 13). Por lo tanto, los autores concluyen que ambos ejercen el mismo efecto beneficioso en condiciones de IRD in vivo.

Todos los datos anteriores demuestran que la inyección de miR-204/211 en la retina (y particularmente en los fotorreceptores) de modelos in vivo de IRD ejerce un efecto protector sobre los fotorreceptores, particularmente en los conos, al aumentar su supervivencia. Esto es particularmente sorprendente cuando se considera el hecho de que miR-204/211 no es detectable en las células fotorreceptoras (Figura 18).

El potente efecto de miR-204/211 en los fotorreceptores se ve reforzado por la evidencia de que en la retina de un ratón knockout para miR-211, que los autores están caracterizando actualmente, se observó un déficit significativo de la función de los fotorreceptores (Figura 19).

#### Evaluación de la seguridad de la administración de miR-204/miR-211 a la retina de ratones naturales

Para evaluar la seguridad de la administración de miR-204/211 en la fisiología de la retina, los autores llevaron a cabo la administración de miR-204 por vía subretinal en una gran cohorte de ratones adultos C56BL/6 utilizando el mismo esquema descrito anteriormente. Como se muestra en la Figura 14, el análisis electroretinográfico (ERG) demostró que las ondas 'b' no se alteraron en los ojos inyectados con miR-204 en comparación con los ojos de los controles inyectados con EGFP contralateral un mes después de la inyección. Además, los autores llevaron a cabo un análisis similar en ratones naturales inyectados en P4 y los autores realizaron el análisis ERG en P30. También en este caso, los autores no pudieron detectar ninguna alteración significativa de la amplitud de las ondas 'b' en las retinas de los ojos inyectados con miR-204 en comparación con los ojos de controles inyectados con EGFP contralateral (Figura 15). Se obtuvieron resultados similares con la administración de premiR-211 mediada por AAV.

Estos datos respaldan la seguridad de la administración de miR-204/211 en retinas saludables.

Los autores proponen que la administración intrarretiniana de miR-204/211, particularmente en las células fotorreceptoras, ejerce un efecto beneficioso en la degeneración de los fotorreceptores, y particularmente en los IRD, incluida la retinitis pigmentosa (formas tanto aisladas como sindrómicas), amaurosis congénita de Leber, distrofias de bastones-conos y distrofias de conos. En particular, esto demuestra un efecto terapéutico obtenido por la administración de miARN individuales en fotorreceptores in vivo.

En la presente invención, los autores demuestran que miR-204/211 tiene un efecto protector en el proceso de degeneración y muerte de los fotorreceptores, que son las condiciones principales que subyacen a las distrofias retinianas hereditarias. En tales enfermedades, la diferenciación y proliferación de RPE anormales no desempeñan funciones patógenas clave.

#### Referencias bibliográficas

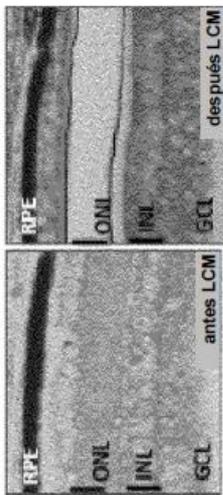
1. J. Couzin, Science 319, 1782 (Mar 28, 2008).
2. N. Meola, V. A. Gennarino, S. Banfi, Pathogenetics 2, 7 (2009).
3. R. Garzon, G. Marcucci, C. M. Croce, Nat Rev Drug Discov 9, 775 (Oct, 2010).
4. J. Kota et al., Cell 137, 1005 (Jun 12, 2009).
5. A. Care et al., Nat. Med. 13, 613 (May, 2007).
6. T. Thum et al., Nature 456, 980 (Dec 18, 2008).

7. D. Cacchiarelli et al., *EMBO Rep* 12, 136 (Feb 1, 2011).
8. J. Elmen et al., *Nature* 452, 896 (Apr 17, 2008).
9. R. E. Lanford et al., *Science* 327, 198 (Jan 8, 2010).
10. A. G. Seto, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1298 (Aug, 2010).
- 5 11. E. L. Berson, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 1659 (1993).
12. F. P. Cremers, et al., *Hum. Mol. Genet.* 11, 1169 (May 15, 2002).
13. C. P. Hamel, *Orphanet J Rare Dis* 2, 7 (2007).
14. M. Michaelides, et al. *Surv. Ophthalmol.* 51, 232 (May-Jun, 2006).
15. M. Karali et al., *BMC Genomics* 11, 715 (2010).
- 10 16. M. Karali, et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 509 (Feb, 2007).
17. I. Conte et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 15491 (Aug 31, 2010).
18. B. P. Lewis, C. B. Burge, D. P. Bartel, *Cell* 120, 15 (Jan 14, 2005).
19. C. Mussolino et al., *Gene Ther.* 18, 637 (Jul, 2011).
20. V. Ramamurthy, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13897 (Sep 21, 2004).
- 15 21. X. Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 13903 (Sep 21, 2004).
22. T. Li, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 14176 (Nov 26, 1996).
23. F. E. Wang et al., *FASEB journal* 24, 1552 (May, 2010).
24. S. Wang, K. M. Koster, Y. He, Q. Zhou, *Future Med Chem* 4, 277 (Mar, 2012).
25. M. Allocca et al., *J. Virol.* 81, 11372 (Oct, 2007).
- 20 26. M. Hildinger et al., *J. Virol.* 75, 6199 (Jul, 2001).
27. G. Gao et al., *Hum. Gene Ther.* 11, 2079 (Oct 10, 2000).
28. F. Q. Liang, V. Anand, A. M. Maguire, J. Bennett, in *Methods in Molecular Medicine*, P. E. Rakoczy, Ed. (Humana Press Inc., 2000), vol. 47, pp. 125-39.
29. A. Li, X. Zhu, C. M. Craft, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 1375 (May, 2002).
- 25 30. Graham, F. L. and van der Eb, A. J., *Virology* 52:456-467, 1973.
31. McCutchan, J. H. and Pagano, J. S., *Natl. Cancer Inst.* 41:351-357, 1968.
32. Chu G, Hayakawa H, Berg P *Nucleic Acids Research* 15 (3): 1311-1326, 1987.
33. Fraley, R. et al., (1980), *J. Biol. Chem.* 255, 10431.
34. Capecchi, M. R. (1980). *Cell* 22: 479-488.
- 30 35. Felgner, P. L., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 84, pp. 7413-7417, 1987.
36. Acheampong A et al, 2002, *Drug Metabol. and Disposition* 30: 421-429.
37. Bennett J, Pakola S, Zeng Y, Maguire A M. *Hum Gene Ther.* 1996; 7:1763-1769.
38. Ambatia, J., and Adamis, A. P., *Progress in Retinal and Eye Res.* 2002; 21: 145-151.
39. Cheng Y, Ji R, Yue J, et al. *Am J Pathol* 2007; 170: 1831-1840.

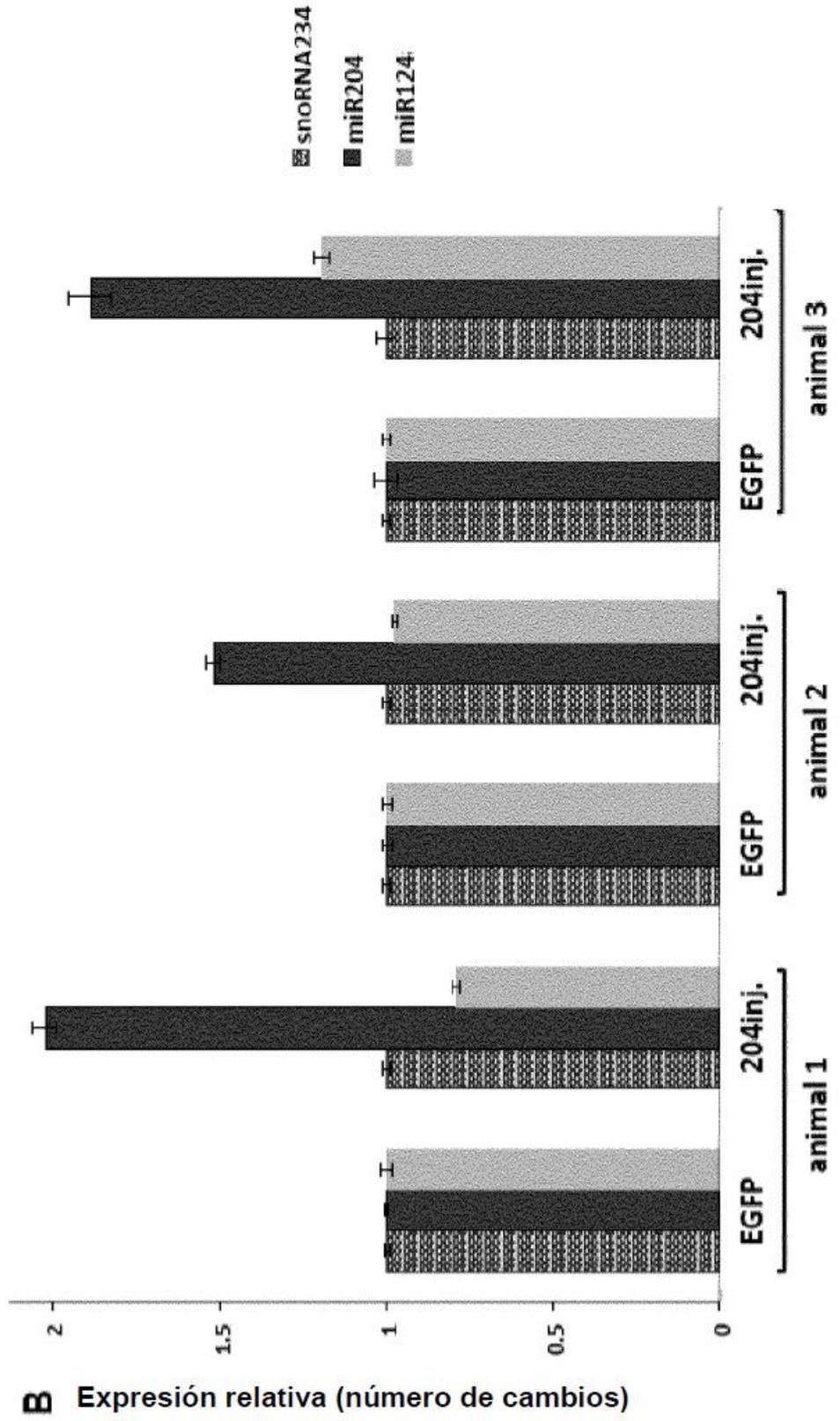
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un agente seleccionado del grupo que consiste en: un miARN, un precursor de miARN, un miARN maduro, un mimético de miARN o una mezcla de miméticos de miARN, una molécula de ADN que codifica dicho miARN, dicho precursor de miARN, dicho miARN maduro, dicho mimético de miARN o una mezcla de miméticos de miARN, o cualquiera de sus combinaciones para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una distrofia retiniana, en donde dicho agente comprende la secuencia semilla UUCCCUU o codifica una secuencia de nucleótidos que comprende la secuencia semilla UUCCCUU.
- 10 2. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el miARN que comprende la secuencia semilla UUCCCUU comprende la secuencia madura de miR-204 o la secuencia madura de miR-211.
- 15 3. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dicho agente es la secuencia madura de miR-204 o la secuencia madura de miR-211.
4. El agente para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho agente se proporciona dentro de un vehículo de suministro, opcionalmente en el que el vehículo de administración se selecciona de un vector viral, microesferas, liposomas, partículas de oro coloidal, lipopolisacáridos, polipéptidos, polisacáridos, o pegilación de vehículos virales.
- 20 5. El agente para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la distrofia retiniana se caracteriza por la degeneración de fotorreceptores, preferiblemente la distrofia retiniana es una distrofia retiniana hereditaria, más preferiblemente la degeneración retiniana hereditaria se selecciona del grupo que consiste en: Retinitis Pigmentosa (RP), Amaurosis congénita de Leber (LCA), distrofias de conos y bastones y distrofias de conos.
- 25 6. Una composición farmacéutica que comprende al menos un agente como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una distrofia retiniana.
7. Un ácido nucleico que codifica para el agente como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una distrofia retiniana.
- 30 8. Un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de codificación para el agente como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 bajo el control de un promotor adecuado para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una distrofia retiniana, preferiblemente el promotor adecuado es la secuencia promotora de la rodopsina.
- 35 9. El vector de expresión recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además una o más formas naturales de una secuencia codificante mutada responsable de la distrofia retiniana bajo el control de un promotor adecuado, preferiblemente una o más formas naturales de la secuencia de codificación mutada responsable de la distrofia retiniana se selecciona del grupo que consiste en: de SEQ ID NO: 23 a SEQ ID NO: 414.
10. El vector de expresión recombinante para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, que es un derivado de AAV.
- 40 11. Una célula huésped transformada por el vector de expresión recombinante como se define en las reivindicaciones 8 a 10 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una distrofia retiniana.
- 45 12. Una composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico como se define en la reivindicación 7 o el vector de expresión recombinante como se define en las reivindicaciones 8 a 10 o la célula huésped según la reivindicación 11 y excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una distrofia retiniana, preferiblemente la composición comprende además una o más formas naturales de una secuencia codificante mutada responsable de la distrofia retiniana bajo el control de un promotor adecuado, más preferiblemente la forma natural de la secuencia codificante mutada responsable de la distrofia retiniana se inserta en un vector de expresión recombinante adicional, preferiblemente una o más formas naturales de la secuencia de codificación mutada responsable de la distrofia retiniana se selecciona del grupo que consiste en: de SEQ ID NO: 23 a SEQ ID NO: 414.
13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 12, en la que dicha composición es para la administración intraocular.

FIGURA 1



A



B

FIGURA 2

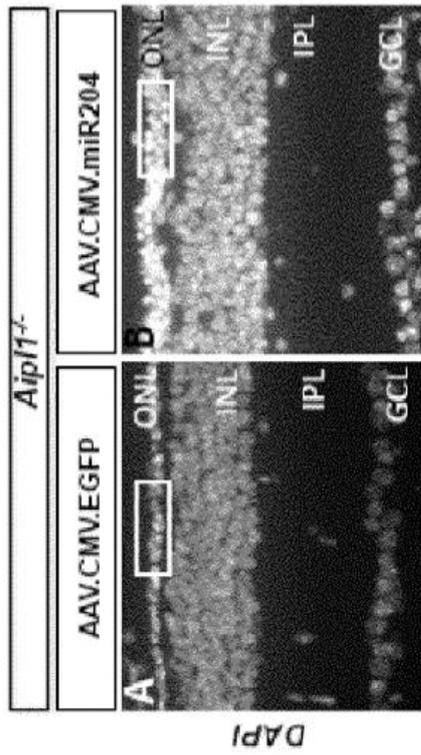
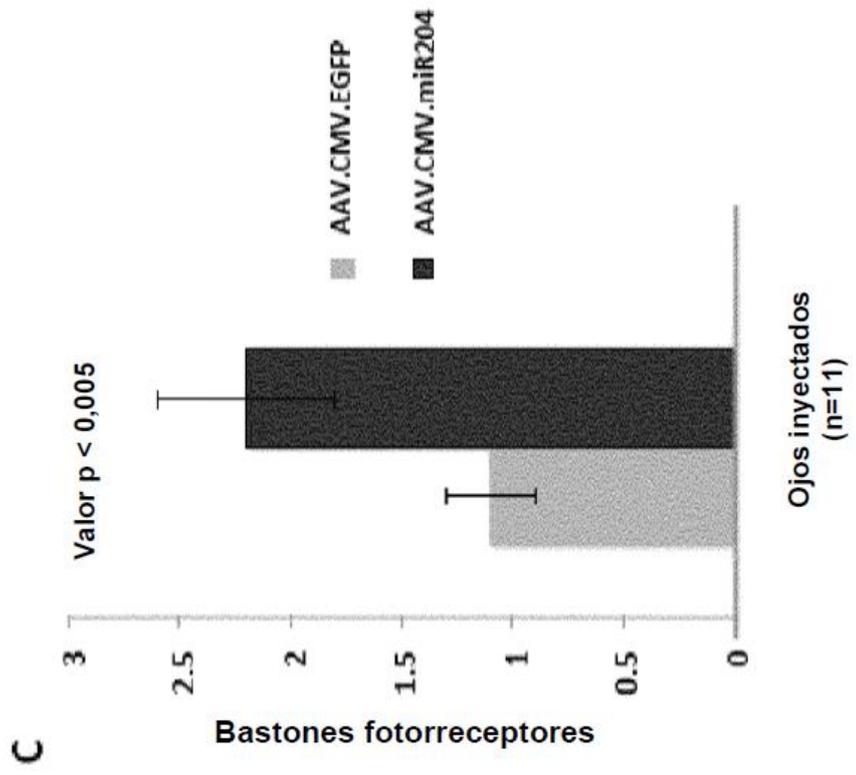


FIGURA 3

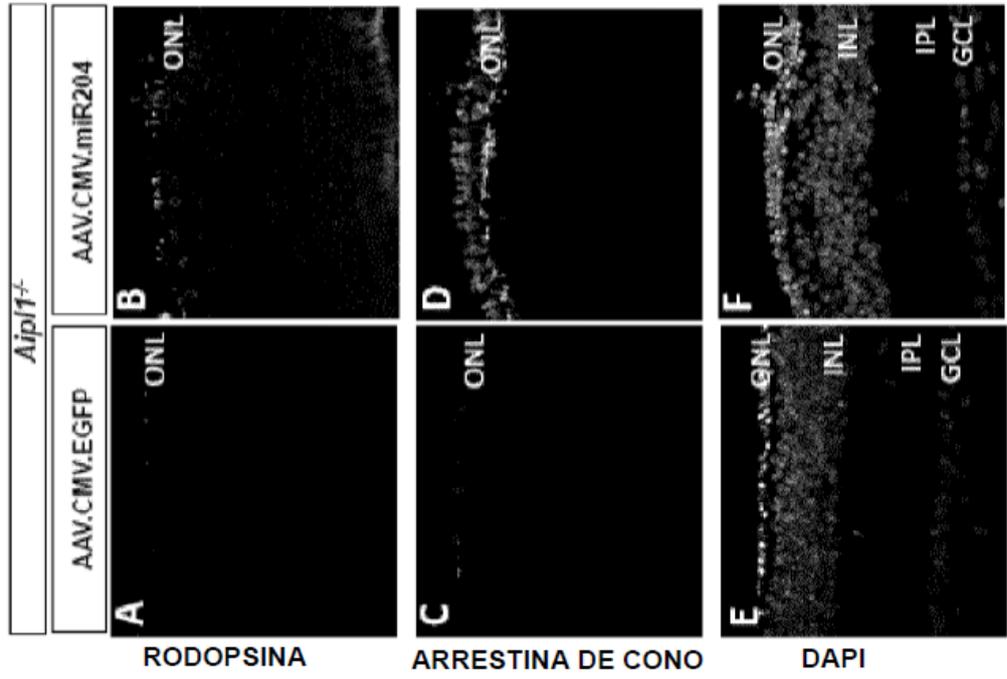


FIGURA 4

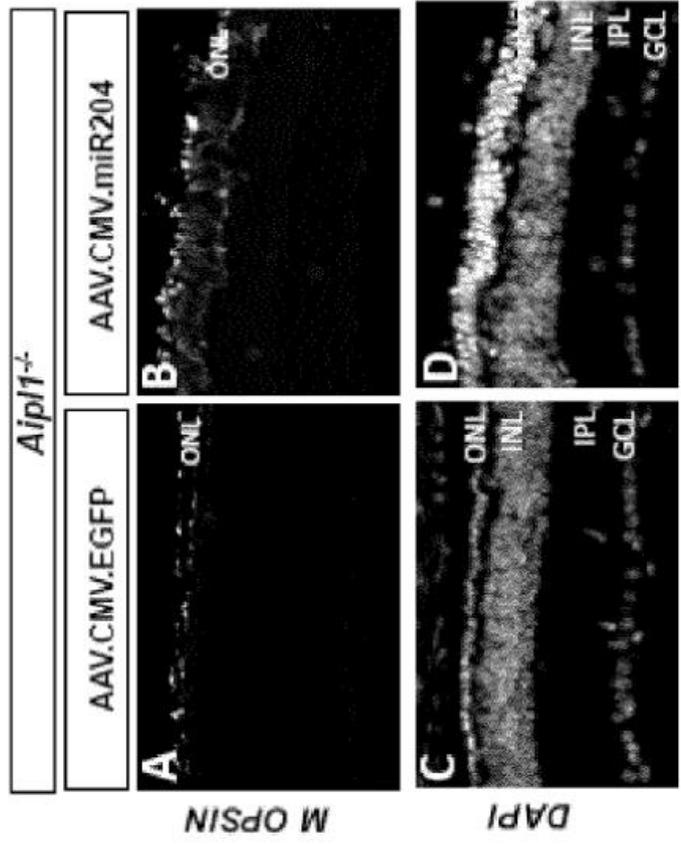


FIGURA 5

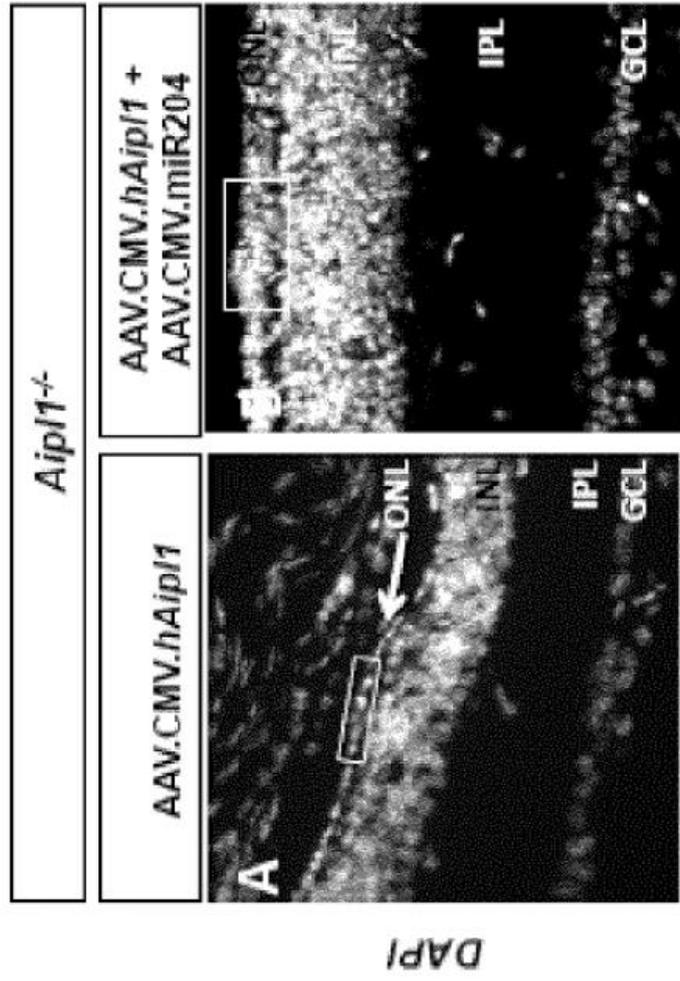


FIGURA 6

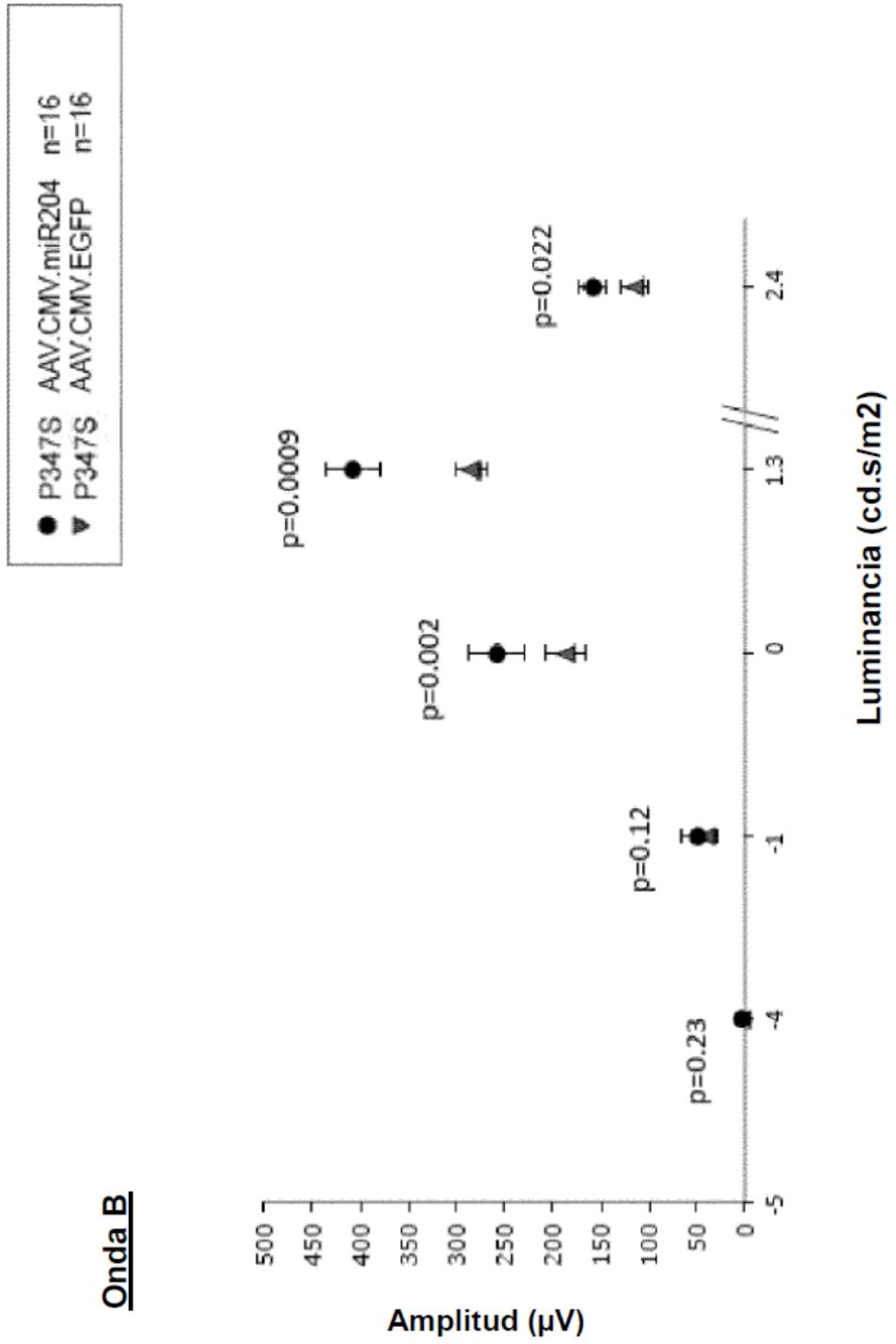


FIGURA 7

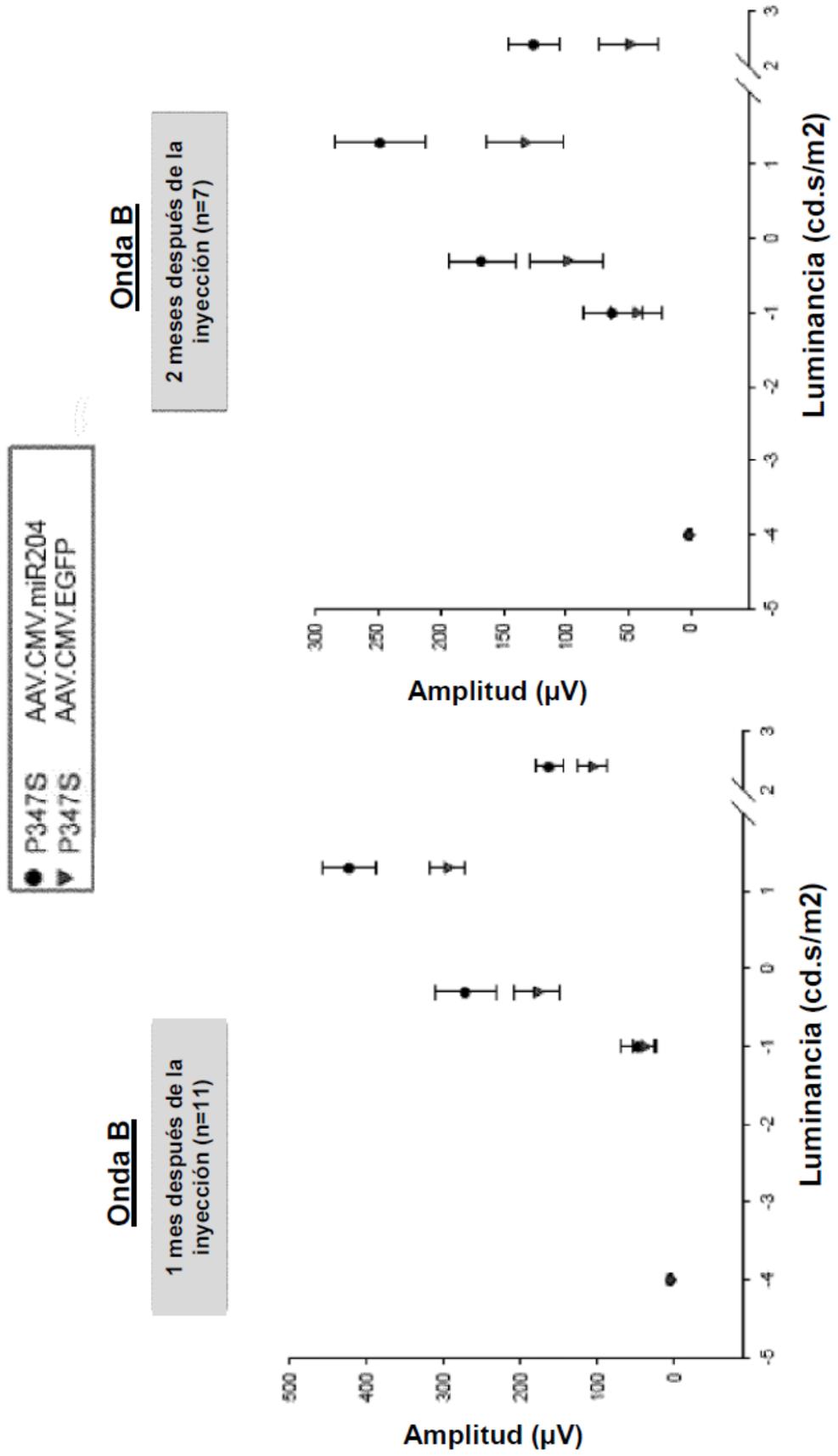




FIGURA 9

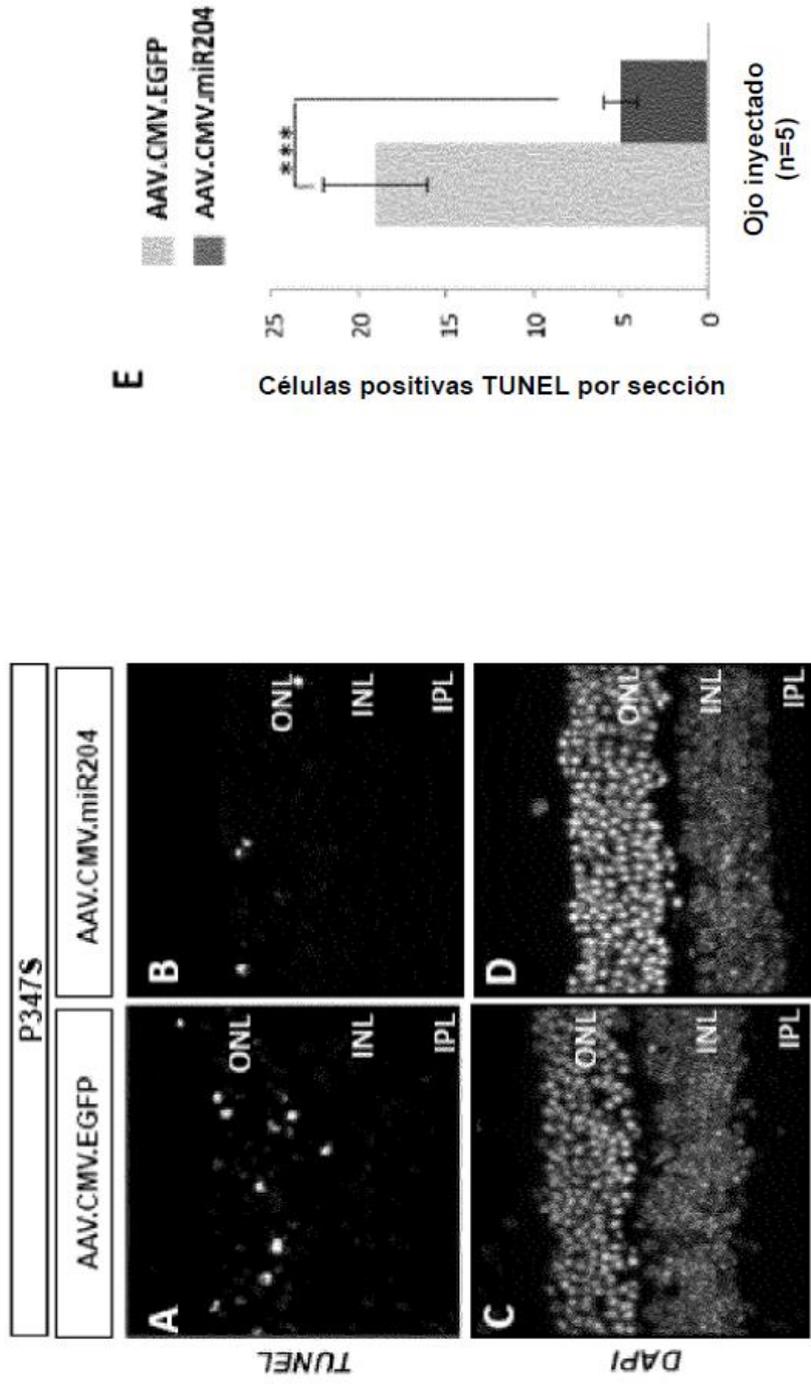


FIGURA 10

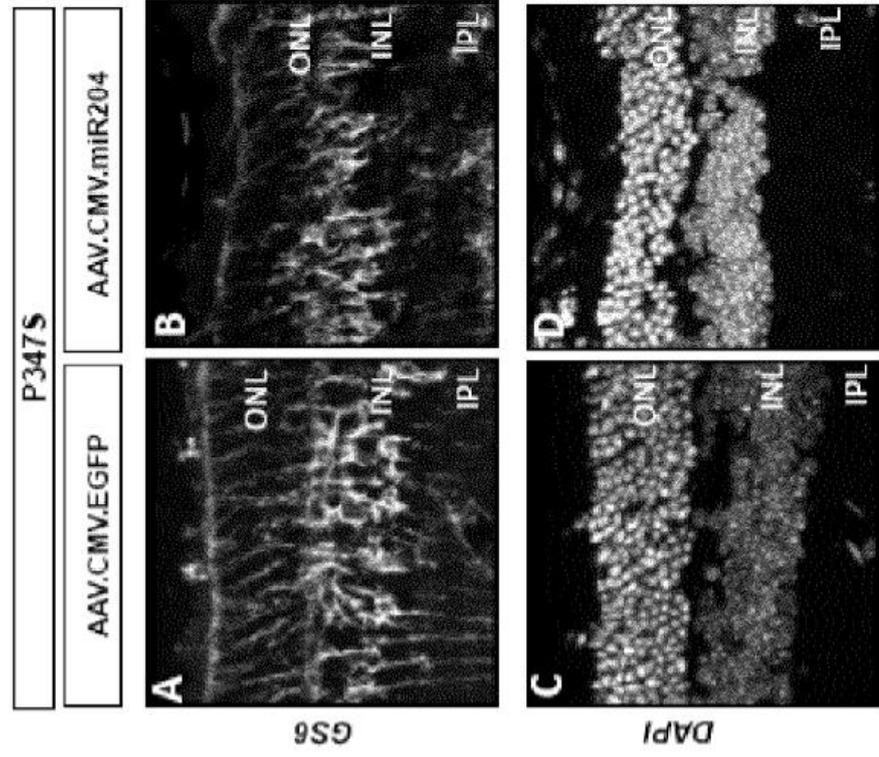


FIGURA 11

Onda B

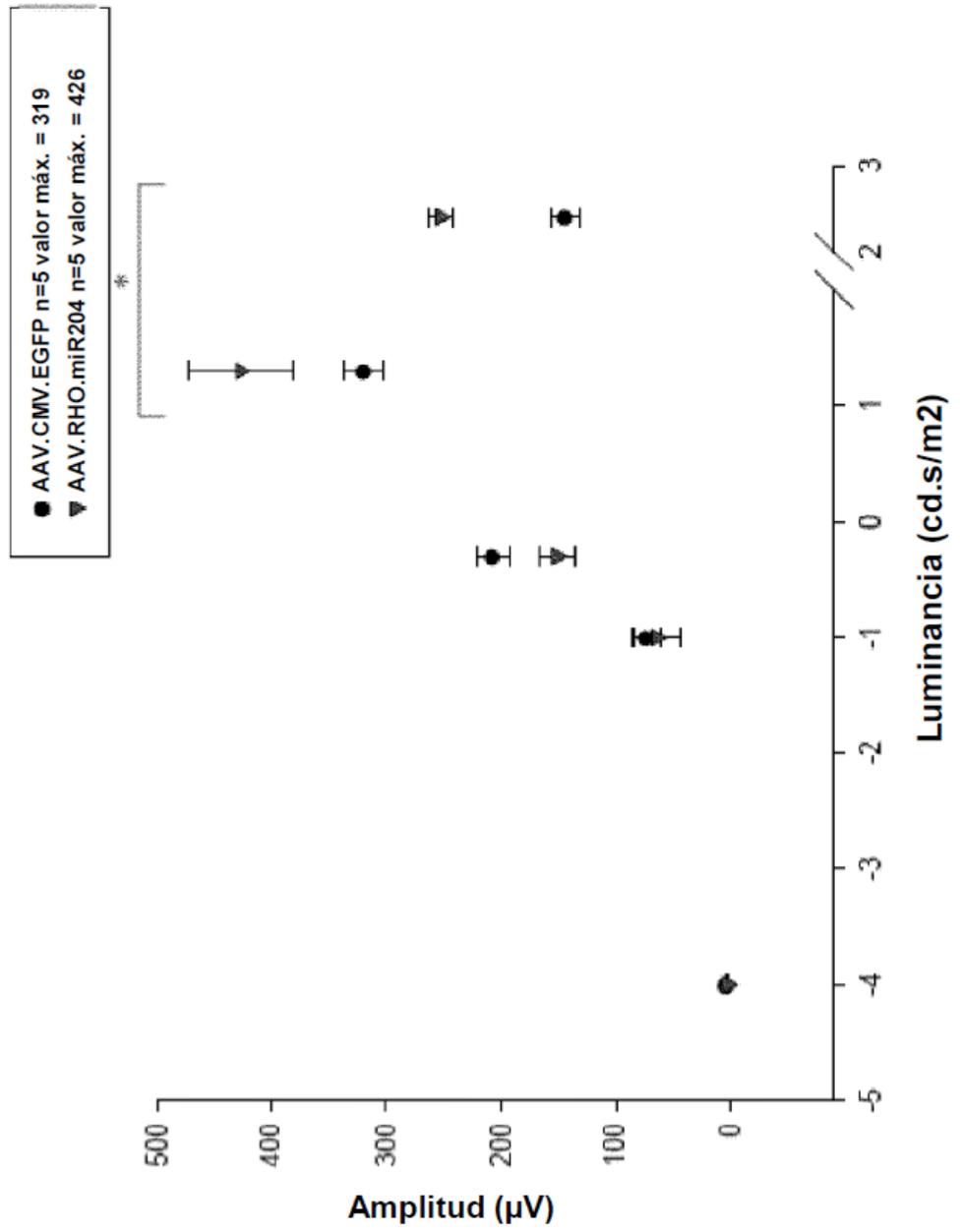


FIGURA 12

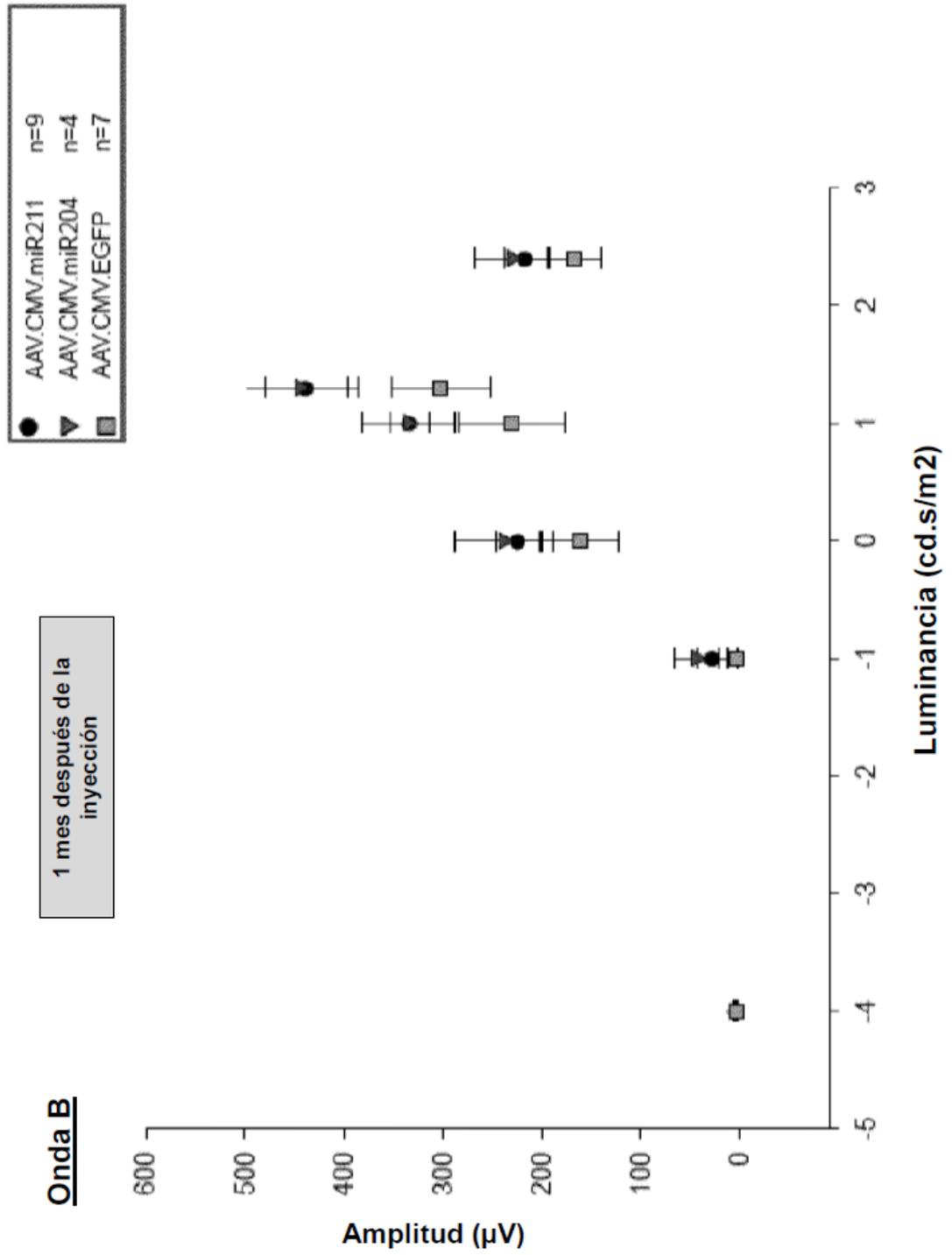


FIGURA 13

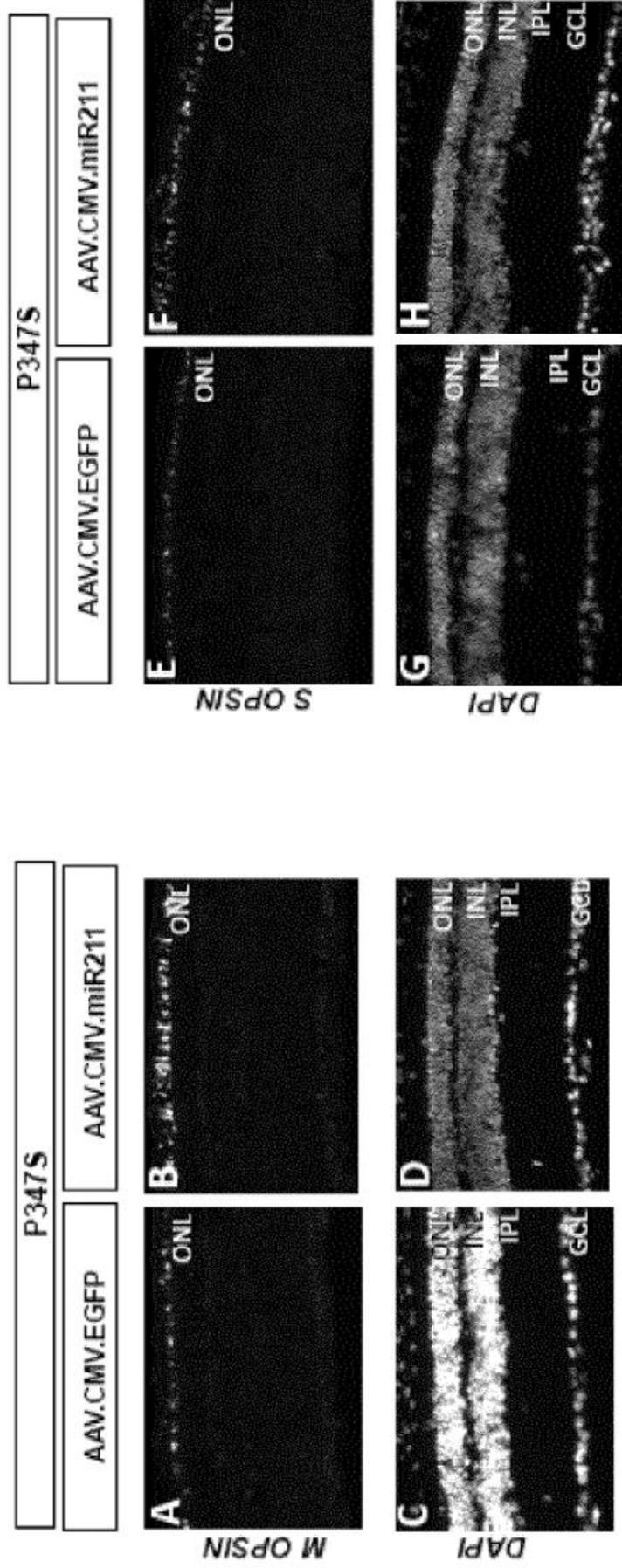


FIGURA 14

Onda B

● AAV.CMV.EGFP n=35 valor máx. = 797  
 ▼ AAV.CMV.miR204 n=35 valor máx. = 757

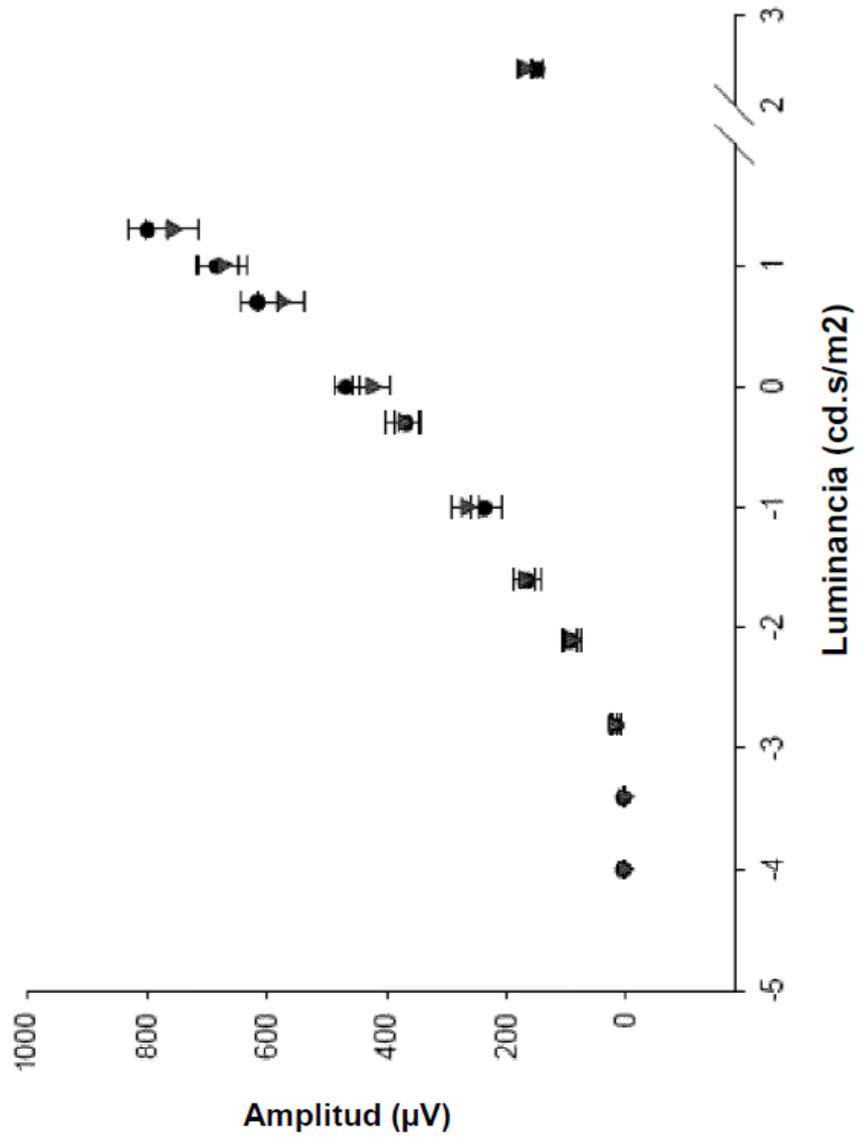


FIGURA 15

Onda B

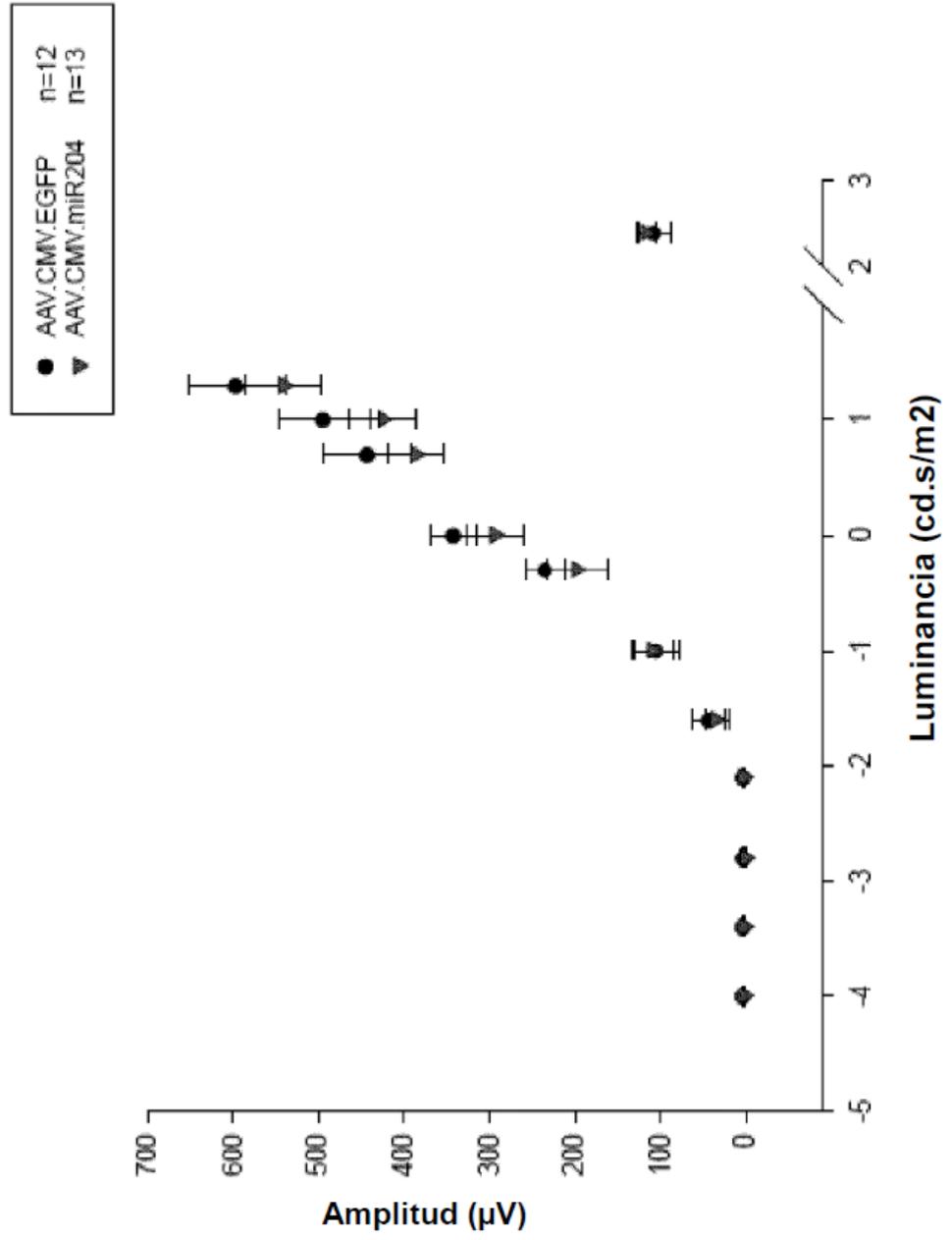


FIGURA 16

Onda B

● AAV.CMV.EGFP n=56 valor máx. = 340 ph=163  
▼ AAV.CMV.miR204 n=39 valor máx. = 448 ph=200

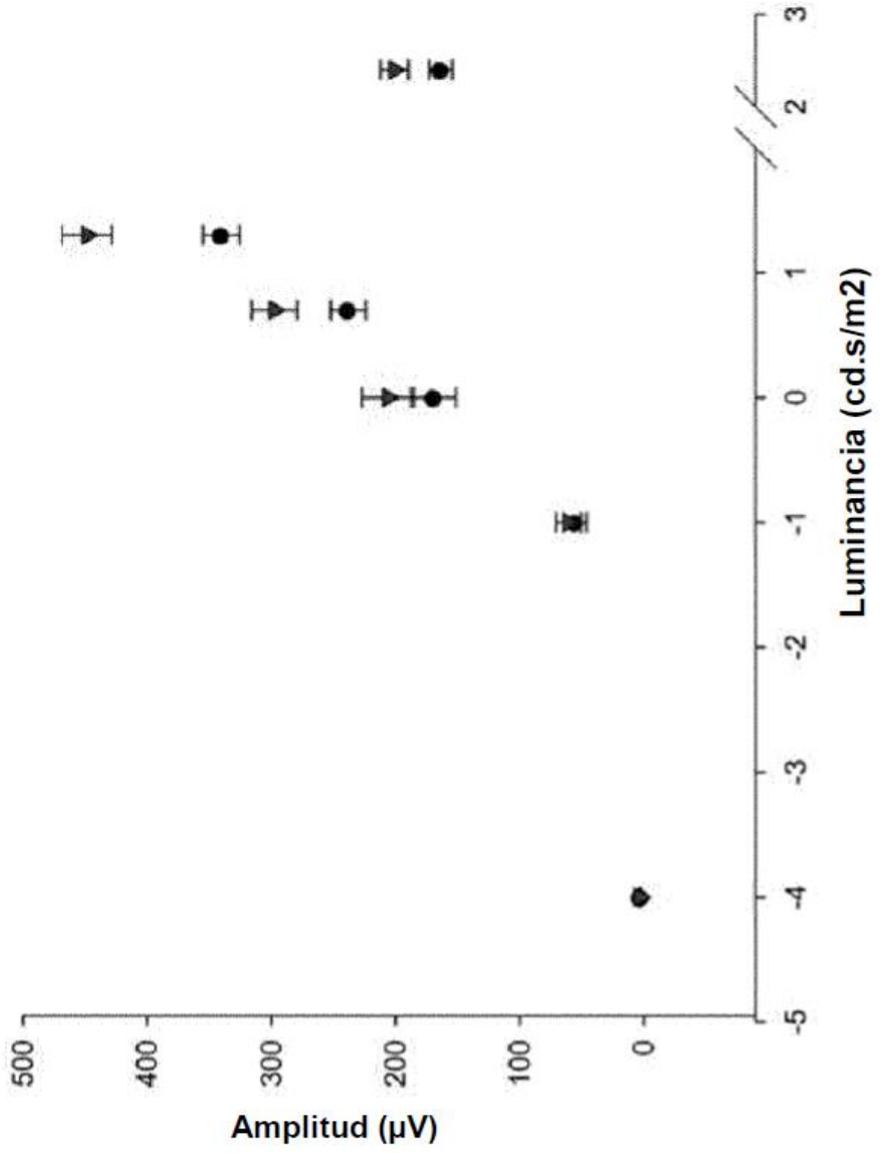
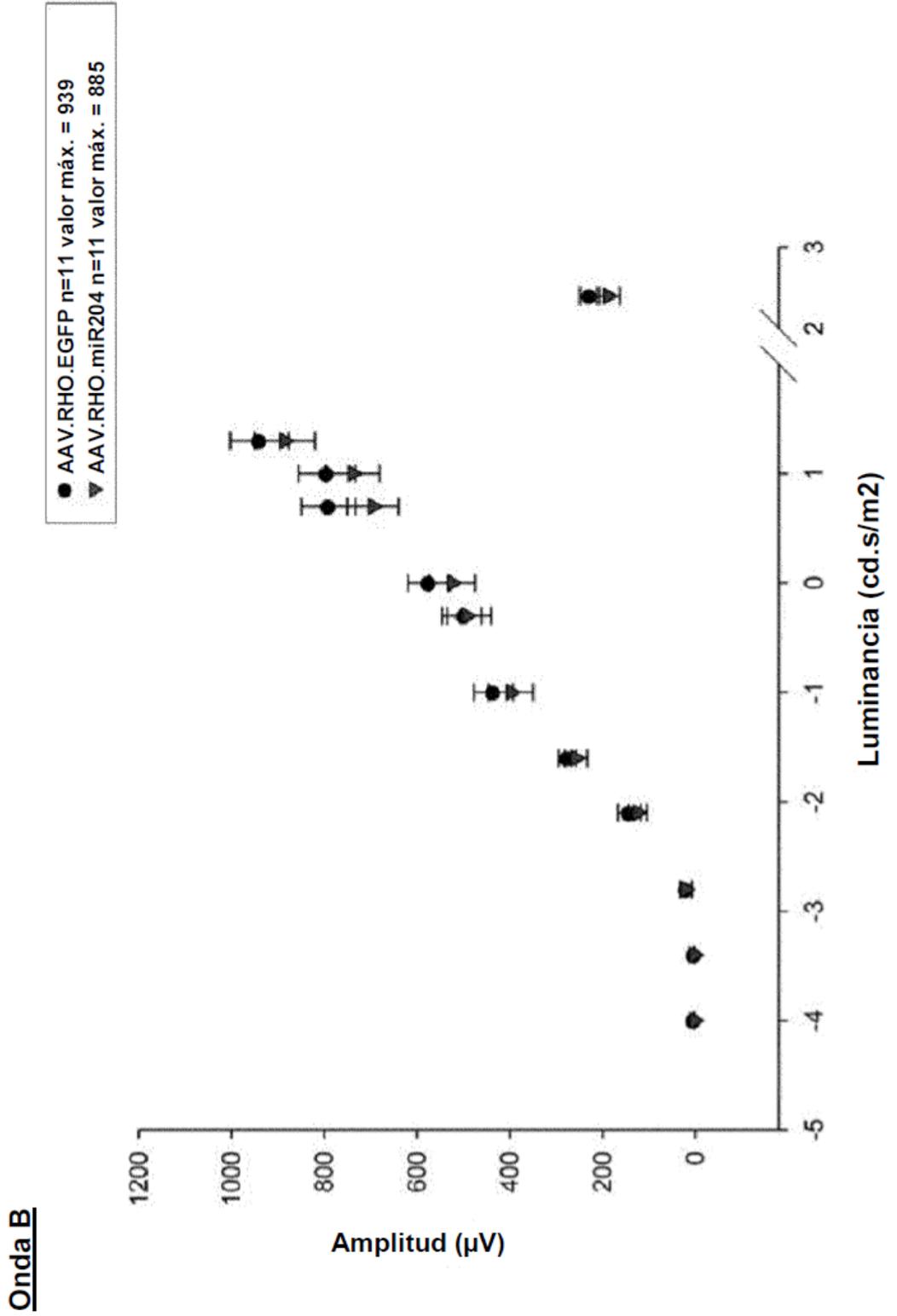


FIGURA 17



**FIGURA 18**

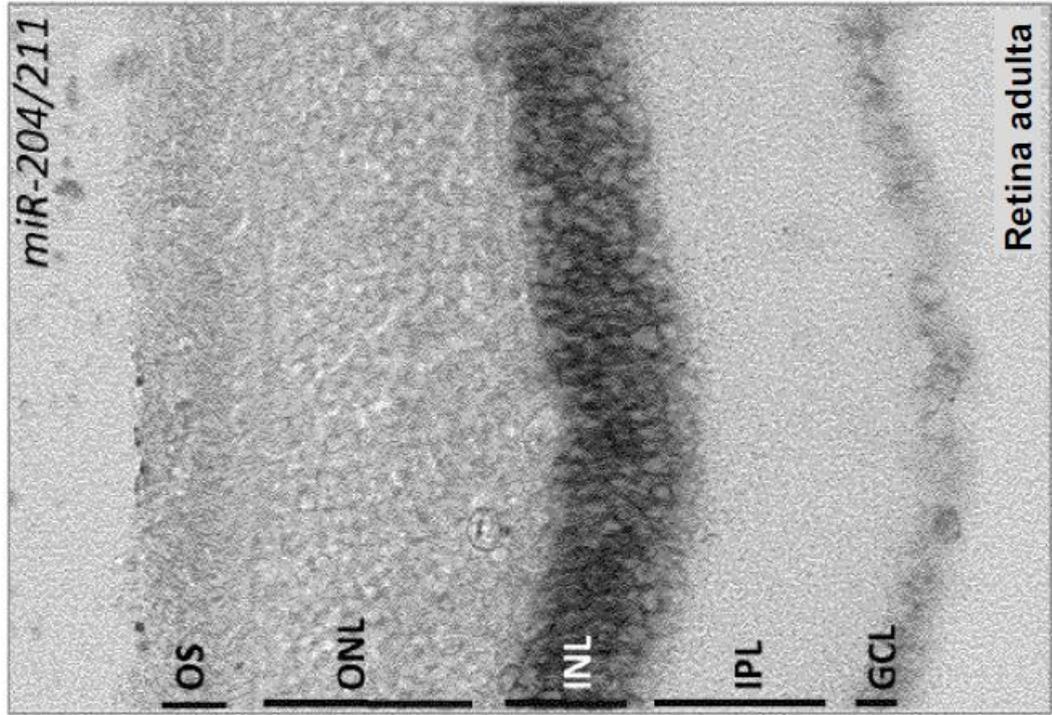


FIGURA 19

Onda B

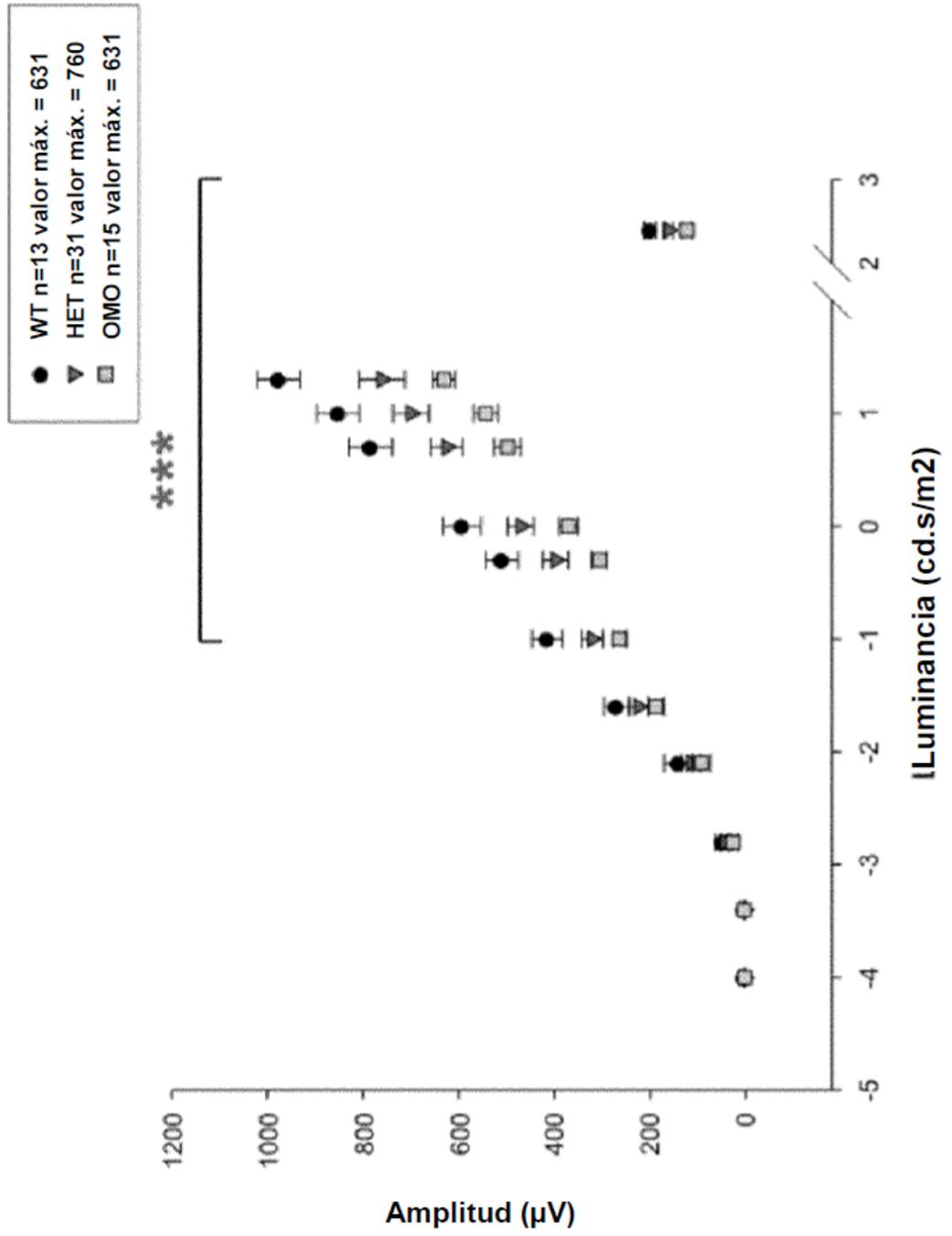


FIGURA 20

