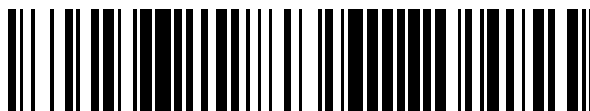


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 677**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/86** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2014 PCT/EP2014/058000**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.10.2014 WO14170480**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2014 E 14721802 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2986635**

54 Título: **Suministro eficaz de genes grandes por vectores de AAV duales**

30 Prioridad:

**18.04.2013 US 201361813342 P**

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

**19.03.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**AURICCHIO, ALBERTO;  
COLELLA, PASQUALINA y  
TRAPANI, IVANA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 704 677 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

Suministro eficaz de genes grandes por vectores de AAV duales

## Campo técnico

5 La presente invención se refiere a construcciones, vectores, células hospedantes relacionadas y composiciones farmacéuticas que permiten conseguir una terapia génica eficaz, en particular de genes mayores que 5Kb.

## Antecedentes de la invención

10 La degeneraciones retinianas heredadas ("inherited retinal degeneration", IRD), con una prevalencia global total de 1/2.000 (1), son una importante causa de ceguera en todo el mundo. Entre las IRD más frecuentes y graves se encuentran la retinitis pigmentosa (RP), la amaurosis congénita de Leber ("Leber congenital amaurosis", LCA), y la enfermedad de Stargardt ("Stargardt disease", STGD), que casi siempre se heredan como trastornos monogénicos. La mayoría de las mutaciones que provocan IRD se producen en genes expresados en fotorreceptores ("photoreceptors", PR) neuronales, bastones y/o conos en la retina (2). En la actualidad no existe ninguna terapia disponible para estas enfermedades que producen ceguera.

15 La terapia génica es muy prometedora para el tratamiento las IRD. Entre los vectores de transferencia de genes disponibles, los más eficaces son los virus adenoasociados ("adeno-associated virus", AAV) pequeños para dirigirse a los PR y al epitelio pigmentario retiniano ("retinal pigment epithelium", RPE) (3-4) para el tratamiento a largo plazo tras una única administración subretiniana (3-4). En fechas recientes, los inventores y otros han demostrado que la administración subretiniana de AAV es bien tolerada y es eficaz para mejorar la visión en pacientes afectados por LCA de tipo 2, que es provocada por mutaciones en RPE65, un gen expresado en el RPE (5-9). Estos resultados son prometedores con respecto al tratamiento de otras formas de LCA y de IRD en general. La disponibilidad de vectores de serotipos de AAV, tales como AAV2/8, que se dirige con eficacia a los PR (10-14) y al RPE, apoya aún más esta estrategia. Sin embargo, una limitación importante del AAV es su capacidad de carga, que se cree que se limita a aproximadamente 5 kb, el tamaño del genoma vírico parental (15-19). Esto limita la aplicación de las estrategias de terapia génica con AAV para IRD habituales que están provocadas por mutaciones en genes cuya secuencia codificadora ("coding sequence", CDS) es mayor que 5 kb (denominados en la presente genes grandes).  
25 Estos incluyen:

ENFERMEDAD	GEN	CDS	EXPRESIÓN
Enfermedad de Stargardt	ABCA4	6,8 Kb	PR de bastones y conos
Usher 1B	MYO7A	6,7 Kb	RPE y PR
Amaurosis congénita de Leber 10	CEP290	7,5 Kb	principalmente en PR (panretinianas)
Usher1D, sordera no sindrómica, autosómica recesiva (DFNB12)	CDH23	10,1 Kb	PR
Retinitis pigmentosa	EYS	9,4 Kb	PR ECM
Usher 2A	USH2a	15,6 Kb	PR de bastones y conos
Usher 2C	GPR98	18,0 Kb	principalmente en PR
Síndrome de Alstrom	ALMS1	12,5 Kb	PR de bastones y conos

30 La enfermedad de Stargardt (STGD; MIM#248200) es la forma más habitual de degeneración macular heredada provocada por mutaciones en el gen ABCA4 (CDS: 6822 pb), que codifica el transportador retiniano todo-trans localizado en el segmento externo del PR (20); el síndrome de Usher de tipo 1B (USH1B; MIM#276900) es la forma más grave de RP y sordera, y es provocado por mutaciones en el gen MYO7A (CDS: 6648 pb) (21) que codifica el MYO7A no convencional, un motor basado en actina expresado en PR y RPE dentro de la retina (22-24).

35 La distrofia de conos-bastones de tipo 3, el fundus flavimaculatus, la degeneración macular relacionada con la edad de tipo 2, la distrofia retiniana grave de aparición temprana, y la retinitis pigmentosa de tipo 19 también están asociados con mutaciones en ABCA4 (enfermedades asociadas a ABCA4).

Se han investigados diversas estrategias para solucionar la limitación de la capacidad de carga del AAV. Varios grupos, incluyendo el de los inventores, han intentado "obligar a entrar" a genes grandes dentro de una de las

5 muchas cápsidas de AAV disponibles desarrollando los denominados vectores sobredimensionados (25-27). Aunque la administración de vectores de AAV sobredimensionados logra niveles terapéuticamente importantes de expresión de transgenes en modelos de roedores y caninos de enfermedades humanas heredadas (27-30), que incluyen la retina de los modelos de ratón *Abca4*<sup>-/-</sup> y *shaker 1 (sh1)* de STGD y *USH1B* (27, 30), el mecanismo que subyace a la transducción mediada por AAV sobredimensionados sigue sin estar claro. Por contraste con lo que han propuesto originariamente los inventores y otros (25-27), los vectores de AAV sobredimensionados no contienen una población pura de genomas de gran tamaño intactos, sino una mezcla heterogénea de genomas en su mayoría truncados con una longitud de  $\leq 5$  kb (15-18). Tras la infección, se ha propuesto que el reensamblaje de estos genomas truncados en el núcleo de la célula diana sea un mecanismo para la transducción de vectores de AAV sobredimensionados (15-17, 31). Independientemente del mecanismo de transducción y de la eficacia *in vivo*, la heterogeneidad de los tamaños de los genomas de AAV sobredimensionados es una limitación importante para su aplicación en terapia génica humana.

15 Como alternativa, se ha aprovechado la capacidad inherente de los genomas de AAV para sufrir una concatemerización intermolecular (32) para transferir genes grandes *in vivo* dividiendo un módulo de expresión de un gen grande en dos mitades (con un tamaño  $< 5$  kb), cada una contenida en dos vectores de AAV distintos (duales) (33-35). En la estrategia de transruptura de AAV duales, se coloca una señal donante de ruptura ("splice donor", SD) en el extremo 3' de la mitad 5' del vector, y se coloca una señal aceptora de ruptura ("splice acceptor", SA) en el extremo 5' de la mitad 3' del vector. Tras la coinfección de la misma célula por los vectores de AAV duales y la concatemerización de cabeza a cola mediada por una repetición terminal invertida ("inverted terminal repeat", ITR) de las dos mitades, la transruptura provoca la producción de un ARNm maduro y la proteína de tamaño completo (33). La transruptura se ha empleado con éxito para expresar genes grandes en el músculo y la retina (36-37).

20 En particular, Reich *et al.* (37) han empleado la estrategia de transruptura con cápsidas de AAV2 y AAV5 y han demostrado que ambos vectores transducen el epitelio pigmentario de la retina y los fotorreceptores empleando el gen LacZ como gen indicador. Esta estrategia no ha sido empleada utilizando un gen terapéutico y/o grande.

25 Como alternativa, las dos mitades del módulo de expresión de un transgén grande contenidas en vectores de AAV duales pueden contener secuencias solapantes homólogas (en el extremo 3' de la mitad 5' del vector y en el extremo 5' de la mitad 3' del vector, solapamiento de AAV duales), que mediarán en la reconstitución de un único genoma grande mediante recombinación homóloga (34). Esta estrategia depende de las propiedades recombinogénicas de las secuencias solapantes del transgén (38). Una tercera estrategia de AAV duales (híbridos) se basa en añadir una región altamente recombinogénica procedente de un gen exógeno [concretamente, fosfatasa alcalina ("alkaline phosphatase", AP (35, 39))] al vector de transruptura. La región añadida se coloca cadena abajo de la señal SD en la mitad 5' del vector y cadena arriba de la señal SA en la mitad 3' del vector para aumentar la recombinación entre los AAV duales. El documento US2010/003218 se dirige a un sistema de vector dual híbrido basado en AP. El documento demuestra la eficacia de transducción del vector dual híbrido basado en AP que expresa minidistrofina, pero no ofrece datos con respecto a la eficacia.

30 Lopes *et al.* (30) han estudiado una terapia génica retiniana con un ADNc grande de MYO7A empleando virus adenoasociados y han descubierto que la terapia de MYO7A con vectores individuales de AAV2 o AAV5 es eficaz hasta cierto punto, mientras que la estrategia de AAV2 dual demostró ser menos eficaz. Por tanto, siguen siendo necesarias construcciones y vectores que puedan emplearse para reconstituir la expresión de genes grandes para lograr una terapia génica eficaz.

#### Declaración de financiación

Esta invención se realizó con el apoyo de Italian Telethon Foundation (beca TGM11MT1 y fondos europeos). Italian Telethon Foundation tiene derechos en esta invención.

45 Los estudios sobre las estrategias de transruptura de AAV duales y de AP híbrida de AAV dual se realizaron con el apoyo del gobierno de EE. UU. con el n.º de contrato R24RY019861 otorgado por the National Eye Institute. El gobierno de EE. UU. tiene ciertos derechos sobre esta invención.

#### Sumario de la invención

50 La terapia génica retiniana con vectores víricos adenoasociados (AAV) es segura y eficaz en seres humanos. Sin embargo, la capacidad de carga de AAV limitada a 5 kb impide que pueda aplicarse a terapias para enfermedades retinianas heredadas, tales como la enfermedad de Stargardt (STGD) o el síndrome de Usher de tipo 1B (*USH1B*), que son debidas a mutaciones de genes mayores que 5 kb. Puede que no sea fácil trasladar los métodos previos para la transferencia de genes grandes ensayados en la retina y basados en la encapsulación "forzada" de genes grandes en cápsidas de AAV (AAV sobredimensionados) al escenario clínico debido a la heterogeneidad del tamaño de los genomas del vector, lo cual representa un problema de seguridad.

55 Aprovechando la capacidad de AAV de sufrir una concatemerización intermolecular, los inventores han generado vectores de AAV duales que reconstituyen un gen grande mediante ruptura (transruptura), recombinación homóloga (solapamiento), o una combinación de los dos (híbridos).

Para determinar cuál es la estrategia basada en AAV que transduce con más eficacia genes grandes en la retina, los inventores compararon varias estrategias basadas en AAV entre sí en células HEK293 y en retina de ratón y de cerdo *in vivo* empleando *EGFP*, *ABCA4* o *MYO7A*.

5 Los inventores han descubierto que los vectores de AAV de transruptura dual e híbridos, pero no los vectores de AAV solapantes, transducen con eficacia los fotorreceptores de ratón y cerdo, la principal diana celular para el tratamiento de las degeneraciones retinianas heredadas. Los niveles de transducción retiniana logrados por los AAV duales de transruptura dual o híbridos provocaron una mejora significativa del fenotipo de los modelos de ratón *Abca4*<sup>-/-</sup> y *sh1* de STGD y USH1B. Los vectores de transruptura de AAV duales o híbridos son una estrategia atractiva para la terapia génica de enfermedades retinianas que requieren el suministro de genes grandes.

10 Por tanto, una realización de la presente invención es un sistema de construcción dual para expresar la secuencia codificadora de un gen de interés en una célula hospedante, y dicha secuencia codificadora consiste en una porción del extremo 5' y una porción del extremo 3', y dicho sistema de construcción dual comprende:

a) un primer plásmido que comprende, en la dirección 5'-3':

- o una secuencia de repetición terminal invertida 5' ("5'-inverted terminal repeat", 5'-ITR) de AAV;
- 15 o una secuencia de promotor;
- o la porción del extremo 5' de dicha secuencia codificadora, y dicha porción del extremo 5' está unida operablemente a dicho promotor y está bajo su control;
- o una secuencia de ácido nucleico de una señal donante de ruptura; y
- o una secuencia de repetición terminal invertida 3' ("3'-inverted terminal repeat", 3'-ITR) de AAV; y

20 b) un segundo plásmido que comprende, en la dirección 5'-3':

- o una secuencia de repetición terminal invertida 5' (5'-ITR) de AAV;
- o una secuencia de ácido nucleico de una señal aceptora de ruptura;
- o el extremo 3' de dicha secuencia codificadora;
- o una secuencia de ácido nucleico de señal de poliadenilación; y
- 25 o una secuencia de repetición terminal invertida 3' (3'-ITR) de AAV,

en el que dicho primer plásmido comprende además una secuencia de ácido nucleico de una región recombinogénica en la posición 5' del 3'-ITR de AAV de dicho primer plásmido y en la posición 3' de la secuencia de ácido nucleico de la señal donante de ruptura, y en el que dicho segundo plásmido comprende además la secuencia de ácido nucleico de la región recombinogénica en la posición 3' del 5'-ITR de AAV de dicho segundo plásmido y en la posición 5' de la secuencia de ácido nucleico de la señal aceptora de ruptura, en el que la región recombinogénica es una región recombinogénica del fago F1 que consiste en la secuencia:

30 GGGATTTTGCCGATTTCCGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAA  
T (SEQ ID NO:3), o uno de sus fragmentos, que mantiene la propiedad recombinogénica de SEQ ID NO:3 y en el que, tras la introducción de dicho primer plásmido y dicho segundo plásmido en la célula hospedante, dicha secuencia codificadora se reconstituye por medio de las señales donante de ruptura y aceptora de ruptura.

El sistema de construcción dual de la presente invención se aprovecha de modo ventajoso para reconstituir la expresión de genes grandes. Cuando se reconstituye la secuencia codificadora, puede producirse la expresión del gen.

40 La región recombinogénica también puede ser un fragmento de SEQ ID NO:3, y dicho fragmento mantiene las propiedades recombinogénicas de la secuencia de longitud completa. Preferiblemente, el fragmento presenta has 70 %, 75 %, 80%, 85 %, 90 %, 95 % o 99 % de identidad con SEQ ID NO:3.

También preferiblemente, la secuencia de nucleótidos de la ITR se deriva del mismo serotipo de AAV o de serotipos diferentes.

45 Preferiblemente, la 3'-ITR del primer plásmido y la 5'-ITR del segundo plásmido provienen del mismo serotipo de AAV.

También más preferiblemente, la 5'-ITR y la 3'-ITR del primer plásmido y la 5'-ITR y la 3'-ITR del segundo plásmido, respectivamente, provienen de diferentes serotipos de AAV.

Preferiblemente, la 5'-ITR del primer plásmido y la 3'-ITR del segundo plásmido provienen de diferentes serotipos de AAV.

También preferiblemente, la secuencia codificadora se divide en la porción del extremo 5' y la porción del extremo 3' en una unión de exón-exón natural.

En una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico de la señal donante de ruptura consiste en la secuencia:

GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTCGAGACA

GAGAAGACTCTTGCGTTTCT (SEQ ID No. 1).

- 5 En una realización preferida, la secuencia de ácido nucleico de la señal aceptora de ruptura consiste en la secuencia:

GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG (SEQ ID NO:2).

La señal aceptora de ruptura y la señal donante de ruptura también pueden ser elegidas por los expertos en la técnica entre las secuencias conocidas en la técnica.

- 10 A menudo se encuentran intrones espliceosómicos dentro de la secuencia de genes que codifican proteínas de eucariotas. Dentro del intrón son necesarios un sitio donante (extremo 5' del intrón), un sitio de ramificación (cerca del extremo 3' del intrón) y un sitio aceptor (extremo 3' del intrón) para la ruptura. El sitio donante de ruptura incluye una secuencia casi invariable GU en el extremo 5' del intrón, dentro de una región más grande y menos altamente conservada. El sitio aceptor de ruptura en el extremo 3' del intrón termina el intrón con una secuencia AG casi invariable. Cadena arriba (dirección 5') de AG existe una región rica en pirimidinas (C y U), o tramo de polipirimidina. Cadena arriba del tramo de polipirimidina está el punto de ramificación, que incluyen un nucleótido de adenina.
- 15

En una realización preferida, el primer plásmido comprende además al menos una secuencia potenciadora, unida operablemente a la secuencia codificadora. Los expertos en la técnica pueden seleccionar cualquier secuencia potenciadora adecuada.

- 20 Preferiblemente, la secuencia codificadora es una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína capaz de corregir una enfermedad genética, en particular una degeneración retiniana heredada.

Aún más preferiblemente, la secuencia codificadora se selecciona del grupo que consiste en: ABCA4, MYO7A, CEP290, CDH23, EYS, USH2a, GPR98 o ALMS1.

Otra realización de la invención es un sistema de vector vírico de virus adenoasociado (AAV) dual, que comprende:

- 25 a) un primer vector vírico de AAV que contiene el primer plásmido que comprende, en la dirección 5'-3': una secuencia de repetición terminal invertida 5' (5'-ITR), una secuencia de promotor, la porción del extremo 5' de dicha secuencia codificadora, y dicha porción del extremo 5' está unida operablemente a dicho promotor y está bajo su control, una secuencia de ácido nucleico de una señal donante de ruptura, y una secuencia de repetición terminal invertida 3' (3'-ITR); y
- 30 b) un segundo vector vírico de AAV que contiene el segundo plásmido que comprende, en la dirección 5'-3': una secuencia de repetición terminal invertida 5' (5'-ITR), una secuencia de ácido nucleico de una señal aceptora de ruptura, el extremo 3' de dicha secuencia codificadora, una secuencia de ácido nucleico de señal de poliadenilación, y una de repetición terminal invertida 3' (3'-ITR).

- 35 También preferiblemente, los vectores de virus adenoasociado (AAV) se seleccionan del mismo serotipo de AAV o de serotipos diferentes.

También preferiblemente, el virus adenoasociado se selecciona del serotipo 2, el serotipo 8, el serotipo 5, el serotipo 7 o el serotipo 9.

Otra realización de la invención es una célula hospedante que comprende el sistema de vector vírico dual según la invención.

- 40 Preferiblemente, la célula hospedante es una célula de mamífero, una célula humana, una célula retiniana, una célula madre no embrionaria.

Otra realización de la invención es el sistema de construcción dual de la invención, el sistema de vector vírico dual de la invención o la célula hospedante de la invención para un uso médico, preferiblemente para un uso en una terapia génica, también preferiblemente para el tratamiento y/o la prevención de una patología o una enfermedad caracterizada por una degeneración retiniana. Preferiblemente, la degeneración retiniana es heredada.

45

También preferiblemente, la patología o la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en retinitis pigmentosa, amaurosis congénita de Leber (LCA), enfermedad de Stargardt, enfermedad de Usher, síndrome de Alstrom, una enfermedad provocada por una mutación en el gen *ABCA4* (también denominada enfermedad asociada a *ABCA4*). La distrofia de conos-bastones de tipo 3, el fundus flavimaculatus, la degeneración macular relacionada con la edad

de tipo 2, la distrofia retiniana grave de aparición temprana, y la retinitis pigmentosa de tipo 19 son ejemplos de enfermedades provocadas por una mutación en el gen ABCA4 (enfermedades asociadas a ABCA4).

5 Otra realización de la invención es una composición farmacéutica que comprende el sistema de construcción dual de la invención, el sistema de vector vírico dual según la invención o la célula hospedante de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Otra realización de la invención es un método para tratar y/o prevenir una patología o una enfermedad caracterizada por una degeneración retiniana, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz del sistema de construcción dual según se describe en la presente, el sistema de vector vírico dual según se describe en la presente o la célula hospedante según se describe en la presente.

10 Otra realización de la invención es un ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO:3 para su uso como región recombinogénica.

Otra realización de la invención es un método *in vitro* para inducir la recombinación genética, que comprende usar la secuencia que consiste en SEQ ID NO:3 para su uso en un método para inducir la recombinación genética.

15 En la presente invención, el promotor preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en un promotor de citomegalovirus, un promotor de rodopsina, un promotor de rodopsina quinasa, un promotor de la proteína de unión a retinoides interfotorreceptores, un promotor de la distrofia macular viteliforme de tipo 2. Sin embargo, puede utilizarse cualquier promotor adecuado conocido en la técnica.

20 En la presente invención, la secuencia codificadora se divide en un primer y un segundo fragmento (la porción del extremo 5' y la porción del extremo 3') e una unión de exón-exón natural. Preferiblemente, cada fragmento de la secuencia codificadora no debe tener un tamaño mayor que 10 kb. Preferiblemente, cada porción del extremo 5' y cada porción del extremo 3' puede tener un tamaño de 4,5 Kb, 5 Kb, 5,5 Kb, 6 Kb, 6,5 Kb, 7 kb, 7,5 Kb, 8 Kb, 8,5 Kb, 9 Kb, 9,5 Kb o un tamaño menor.

25 Durante la pasada década, la terapia génica se ha aplicado al tratamiento de enfermedades en cientos de ensayos clínicos. Se han desarrollado diversas herramientas para transportar genes al interior de células humanas; entre estas, los virus modificados genéticamente, incluyendo los adenovirus, son, en la actualidad, la herramienta más popular para el suministro de genes. La mayoría de los sistemas contienen vectores que son capaces de alojar genes de interés y células auxiliares que pueden proporcionar las proteínas estructurales víricas y las enzimas para permitir la generación de partículas víricas infecciosas que contienen el vector. Los virus adenoasociados son una familia de virus que se diferencian en la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos, la estructura del genoma, la patogenicidad y la gama de hospedantes. Esta diversidad proporciona la oportunidad de emplear virus con diferentes características biológicas para desarrollar diferentes aplicaciones terapéuticas. Al igual que con cualquier herramienta de suministro, la eficacia, la capacidad de dirigirse a ciertos tipos de tejidos o de células, la expresión del gen de interés, y la seguridad de los sistemas basados en adenovirus son importantes para la aplicación con éxito de la terapia génica. Se han dedicado esfuerzos significativos a estas áreas de investigación en los años recientes. Se han realizado diversas modificaciones en los vectores basados en virus adenoasociados y en las células auxiliares para alterar la expresión génica, el suministro a la diana, para mejorar las titulaciones víricas y para aumentar la seguridad. La presente invención representa una mejora en este proceso de diseño, ya que actúa para transportar con eficacia genes de interés dentro de dichos vectores víricos. Los virus son herramientas lógicas para el suministro de genes. Se replican dentro de las células y, por tanto, han desarrollado mecanismos para entrar en las células y emplear la maquinaria celular para expresar sus genes. El concepto de suministro de genes basado en virus consiste en modificar el virus de modo que pueda expresar el gen de interés. Dependiendo de la aplicación específica y del tipo de virus, la mayoría de los vectores víricos contienen mutaciones que dificultan su capacidad para replicarse libremente como virus de tipo salvaje en el hospedante. Se han modificado virus de varias familias diferentes para generar vectores víricos para el suministro de genes. Estos virus incluyen retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes simplex, picornavirus, y alfavirus. La presente invención preferiblemente emplea virus adenoasociados.

35 Un vector basado en virus adenoasociado ideal para el suministro de genes debe ser eficaz, específico de células, regulado y seguro. La eficacia del suministro es importante porque puede determinar la eficacia de la terapia. Los esfuerzos actuales están dirigidos a lograr una infección y expresión génica específica del tipo de célula con vectores víricos adenoasociados. Además, se están desarrollando vectores víricos adenoasociados para regular la expresión del gen de interés, puesto que la terapia puede requerir una expresión regulada o a largo plazo. La seguridad es una cuestión principal para el suministro de genes víricos, puesto que la mayoría de los virus son patógenos o tiene un potencial patogénico. Es importante que, durante el suministro de genes, el paciente no reciba sin querer un virus patogénico que tenga el potencial completo de replicación.

55 El virus adenoasociado (AAV) es un virus pequeño que infecta a seres humanos y a algunas otras especies de primates. En la actualidad, no se conoce que el AAV provoque enfermedades y, en consecuencia, el virus provoca una respuesta inmunológica muy suave. Los vectores de terapia génica que emplean AAV pueden infectar a células en división y quiescentes, y persisten en un estado extracromosómico sin integrarse en el genoma de la célula hospedante. Estas características hacen que el AAV sea un candidato muy atractivo para crear vectores víricos para la terapia génica y para la creación de modelos de enfermedad humanos isogénicos.

El AAV de tipo salvaje ha atraído un considerable interés a los investigadores de la terapia génica debido a una serie de características. La más importante es la aparente falta de patogenicidad del virus. También puede infectar a células que no están en división y tiene la capacidad de integrarse de modo estable en el genoma de la célula hospedante en un sitio específico (denominado AAVS1) en el cromosoma 19 humano. Esta característica hace que sea algo más predecible que los retrovirus, que presentan la amenaza de una inserción aleatoria y de mutagénesis, que a veces es seguida del desarrollo de un cáncer. El genoma de AAV se integra con muchísima frecuencia en el sitio mencionado, y las incorporaciones aleatorias en el genoma se producen con una frecuencia insignificante. Sin embargo, el desarrollo de AAV como vectores de terapia génica ha eliminado esta capacidad integradora por la eliminación de *rep* y *cap* del ADN del vector. El gen deseado, junto con un promotor para dirigir la transcripción del gen, se inserta entre las repeticiones terminales invertidas (ITR) que ayudan a la formación de concatámeros en el núcleo después de que el ADN monocatenario del vector haya sido convertido por los complejos de ADN polimerasa de la célula hospedante en ADN bicatenario. Los vectores de terapia génica basados en AAV forman concatámeros episómicos en el núcleo de la célula hospedante. En las células que no están en división, estos concatámeros permanecen intactos durante la vida de la célula hospedante. En las células en división, el ADN de AAV se pierde por la división celular, puesto que el ADN episómico no se replica junto con el ADN de la célula hospedante. Puede detectarse una integración aleatoria del ADN de AAV en el genoma del hospedante, pero esto sucede con una frecuencia muy baja. Los AAV también presentan una inmunogenicidad muy baja, que parece limitada a la generación de anticuerpos neutralizantes, y al mismo tiempo no inducen una respuesta citotóxica claramente definida. Esta característica, junto con la capacidad para infectar células quiescentes, justifica su dominio frente a los adenovirus como vectores para la terapia génica humana.

#### *Genoma, transcriptoma y proteoma de AAV*

El genoma de AAV está construido de ácido desoxirribonucleico monocatenario (ADNmc), de sentido positivo o negativo, que tiene una longitud de aproximadamente 4,7 kilobases. El genoma comprende repeticiones terminales invertidas (ITR) en ambos extremos de la hebra de ADN, y dos marcos de lectura abierta ("open reading frames", ORF): *rep* y *cap*. El primero está compuesto de cuatro genes solapantes que codifican las proteínas Rep necesarias para el ciclo de vida de AAV, y el último contiene secuencias de nucleótidos solapantes de las proteínas de la cápsida VP1, VP2 y VP3, que interactúan conjuntamente para formar una cápsida de simetría icosaédrica.

#### *Secuencias de ITR*

Las secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) comprenden 145 bases cada una. Se les dio este nombre debido a su simetría, que se demostró que era necesaria para una multiplicación eficaz del genoma del AAV. Otra propiedad de estas secuencias es su capacidad para formar una horquilla, que contribuye al denominado autocebado que permite la síntesis independiente de primasa de la segunda hebra de ADN. También se ha demostrado que las ITR son necesarias para la integración del ADN del AAV en el genoma de la célula hospedante (1º cromosoma en los seres humanos) y para ser rescatado de este, así como para la encapsidación eficaz del ADN del AAV combinado con la generación de partículas de AAV resistentes a la desoxirribonucleasa totalmente ensambladas.

Con respecto a la terapia génica, las ITR parecen ser las únicas secuencias necesarias en cis junto al gen terapéutico; los genes estructurales (*cap*) y de encapsidación (*rep*) pueden suministrarse en trans. Con esta suposición, se han establecido muchos métodos para la producción eficaz de vectores de AAV recombinantes (rAAV) que contienen un gen indicador o terapéutico. Sin embargo, también se ha publicado que las ITR no son los únicos elementos necesarios en cis para la replicación y la encapsidación eficaces. Unos pocos grupos de investigación han identificado una secuencia denominada elemento dependiente de Rep de acción en cis ("cis-acting Rep-dependent element", CARE) dentro de la secuencia codificadora del gen *rep*. Se ha demostrado que CARE aumenta la replicación y la encapsidación cuando está presente en cis.

En 2006 se habían descrito 11 serotipos de AAV, el último en 2004. Todos los serotipos conocidos pueden infectar células de múltiples tipos de tejidos diversos. La especificidad de tejido es determinada por el serotipo de la cápsida, y es probable que la pseudotipificación de los vectores de AAV para alterar su gama de tropismo sea importante para su uso en terapia. En la presente invención, se prefieren las ITR del serotipo 2 y del serotipo 5 de AAV.

#### *Serotipo 2*

El serotipo 2 (AAV2) es el que más se ha estudiado hasta la fecha. El AAV2 presenta un tropismo natural hacia músculos esqueléticos, neuronas, células del músculo liso vascular y hepatocitos.

Se han descrito tres receptores celulares para AAV2: el proteoglicano de sulfato de heparano ("heparan sulfate proteoglycan" HSPG), la integrina  $\alpha_v\beta_5$ , y el receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos ("fibroblast growth factor receptor 1", FGFR-1). El primero funciona como receptor primario, mientras que los dos últimos tienen una actividad de correceptor y permiten al AAV entrar en la célula mediante endocitosis mediada por receptor. Estos resultados de estudios han sido disputados por Qiu, Handa, *et al.* El HSPG actúa como receptor principal, aunque su abundancia en la matriz extracelular puede captar partículas de AAV y alterar la eficacia de la infección.

*Serotipo 2 y cáncer*

Ciertos estudios han demostrado que el serotipo 2 del virus (AAV-2) aparentemente mata a las células del cáncer sin dañar a las células sanas. "Nuestros resultados sugieren que el virus adenoasociado de tipo 2, que infecta a la mayoría de la población, pero que no tiene efectos perjudiciales conocidos, mata a múltiples tipos de células del cáncer, aunque no produce ningún efecto sobre las células sanas", ha declarado Craig Meyers, profesor de inmunología y microbiología de the Penn State College of Medicine de Pensilvania. Esto puede conducir a un nuevo agente anticáncer.

*Otros serotipos*

Aunque AAV2 es el serotipo más popular en diversas investigaciones basadas en AAV, se ha demostrado que otros serotipos pueden ser más eficaces como vectores de suministro de genes. Por ejemplo, AAV6 parece ser mucho más eficaz para infectar células epiteliales de las vías respiratorias, AAV7 presenta una tasa de transducción muy alta de células del músculo esquelético murinas (de modo similar a AAV1 y AAV5), AAV8 es muy bueno para transducir hepatocitos, y AAV1 y 5 han demostrado ser muy eficaces en el suministro de genes a células epiteliales vasculares. En el cerebro, la mayoría de los serotipos de AAV muestran tropismo neuronal, mientras que AAV5 también transduce astrocitos. AAV6, un híbrido de AAV1 y AAV2, también muestra menor inmunogenicidad que AAV2.

Los serotipos pueden diferir con respecto a los receptores a los que se unen. Por ejemplo, la transducción de AAV4 y AAV5 puede ser inhibida por ácidos siálicos solubles (de diferentes formas para cada uno de estos serotipos), y se ha demostrado que AAV5 entra en las células a través del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

En la presente invención, los vehículos de suministro de la presente invención pueden administrarse a un paciente. Los expertos en la técnica podrán determinar las tasas de dosificación apropiadas. El término "administrar" incluye el suministro por medio de técnicas víricas o no víricas. Los mecanismos de suministro víricos incluyen, pero no se limitan a vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores de herpes virus, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos, y vectores baculovíricos, etc., tal como se describió anteriormente. Los mecanismos de suministro no víricos incluyen la transfección mediada por lípidos, liposomas, inmunoliposomas, lipofectina, anfifilos faciales catiónicos ("cationic facial amphiphiles", CFA) y sus combinaciones.

El suministro de uno o más genes terapéuticos por un sistema de vector según la presente invención puede emplearse por sí solo o en combinación con otros tratamientos o componentes del tratamiento.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para tratar a un individuo mediante terapia génica, en la que la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del vector/construcción o célula hospedante de la presente invención que comprende uno o más transgenes terapéuticos y/o de diagnóstico transportables o una partícula vírica producida por estos u obtenida de estos. La composición farmacéutica puede utilizarse en seres humanos o en animales. Generalmente, un médico determinará la dosis real más adecuada para un sujeto individual, y esta variará según la edad, el peso y la respuesta del individuo concreto. La composición puede comprender opcionalmente un vehículo, diluyente, excipiente o adyuvante farmacéuticamente aceptable. La elección del vehículo, excipiente o diluyente farmacéutico se realizará tomando en cuenta la vía prevista de administración y la práctica farmacéutica convencional. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender como vehículo, excipiente o diluyente (o además de este) cualquier ligante, lubricante, agente suspensor, agente de revestimiento, agente solubilizante y otros agentes vehículo adecuados que puedan ayudar o aumentar la entrada del virus en el sitio diana (tal como, por ejemplo, un sistema de suministro de lípidos). Cuando sea apropiado, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse mediante uno cualquiera o más de inhalación, en forma de un supositorio o pesario, por vía tópica en forma de una loción, disolución, crema, ungüento o polvos secantes, mediante el uso de un parche dérmico, por vía oral en forma de comprimidos que contienen excipientes, tales como almidón o lactosa, o en cápsulas u óvulos solos o mezclados con excipientes, o en forma de elixires, disoluciones o suspensiones que contienen agentes aromatizantes o colorantes, o pueden inyectarse por vía parenteral, por ejemplo, por vía intracavernosa, intravenosa, intramuscular o subcutánea. Para la administración parenteral, las composiciones pueden utilizarse del mejor modo en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, las sales o los monosacáridos suficientes para que la disolución sea isotónica con la sangre. Para la administración bucal o sublingual, las composiciones pueden administrarse en forma de comprimidos o pastillas para chupar que pueden formularse de modo convencional.

Los expertos en la técnica conocen los métodos convencionales para la incorporación de un polinucleótido o un vector en una célula hospedante, por ejemplo, transfección, lipofección, electroporación, microinyección, infección vírica, choque térmico, transformación después de la permeabilización química de una membrana o fusión celular.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "células hospedante o célula hospedante genéticamente modificada" se refiere a células hospedantes que han sido transducidas, transformadas o transfectadas con la construcción o con el vector previamente descrito.

Como ejemplos representativos de células hospedantes apropiadas se pueden citar células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*, células fúngicas, tales como levaduras, células de insecto, tales



como Sf9, células animales, tales como CHO o COS, células vegetales, etc. Se considera que la selección de un hospedante apropiado se encuentra dentro del alcance de los expertos en la técnica partiendo de las indicaciones de la presente. Preferiblemente, dicha célula hospedante es una célula animal, y lo más preferiblemente una célula humana. La invención proporciona además una célula hospedante que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinantes descritos en la presente. La célula hospedante puede ser una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo, un ser humano. La célula hospedante puede ser una célula adherente o una célula suspendida, es decir, una célula que crece en suspensión. En la técnica se conocen células hospedantes adecuadas e incluye, por ejemplo, DH5 $\alpha$ , células de *E. coli*, células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293 y similares.

La presente invención se ilustrará a continuación por medio de ejemplos no limitantes referidos a los siguientes dibujos.

*Figura 1. Representación esquemática de estrategias basadas en AAV para la transducción de genes grandes.*

CDS: secuencia codificadora; pA: señal de poliadenilación; SD: señal donante de ruptura; SA: señal aceptora de ruptura; AP: región recombinogénica de la fosfatasa alcalina (39); AK: región recombinogénica del fago F1. Las líneas discontinuas muestran la ruptura que se produce entre SD y SA, y las líneas de puntos muestran las regiones solapantes disponibles para la recombinación homóloga. Los inventores descubrieron que puede utilizarse la transruptura dual y una AK híbrida para reconstituir la expresión de genes grandes con éxito. En particular, los vectores de transruptura dual y de AK híbrida, pero no los vectores solapantes y de AP híbrida, transducen con eficacia los fotorreceptores de ratón y de cerdo. Los plásmidos de vector de tamaño normal y de AAV sobredimensionado contienen módulos de expresión de longitud completa que incluyen el promotor, la CDS del transgén de longitud completa y la señal de poliadenilación (pA) (tabla 1). Los dos plásmidos de vector de AAV distintos (5' y 3') necesarios para generar vectores de AAV duales contienen el promotor seguido de la porción N-terminal de la CDS del transgén (plásmido 5') o la porción C-terminal de la CDS del transgén seguida de la señal de pA (plásmido 3', tabla 1). La estructura de todos los plásmidos se indica en la sección de materiales y métodos.

*Figura 2. Los vectores de solapamiento de AAV duales, de transruptura y de AK híbrida transducen con eficacia genes grandes in vitro.*

Transferencia Western de células HEK293 infectadas con vectores AAV2/2 que codifican EGFP (A y D), ABCA4 (B y E) y MYO7A (C y F). (A a C): Las flechas indican las proteínas de longitud completa, los microgramos de proteínas cargados se indican bajo cada carril, y la escalera de peso molecular se indica a la izquierda. (D a F): Cuantificación de las bandas de proteínas EGFP (D), ABCA4 (E) y MYO7A (F). La intensidad de las bandas de EGFP, ABCA4 y MYO7A se dividió entre la intensidad de las bandas de tubulina (D) o filamina A (E-F). Los histogramas muestran la expresión de las proteínas como un porcentaje relativo a los vectores de transruptura ("trans-splicing", TS) de AAV duales, y el valor promedio se indica bajo la barra correspondiente. Barras de error: promedio  $\pm$  e.e.p. (error estándar del promedio). (A-C): Las imágenes de la transferencia Western son representativas y las cuantificaciones se realizan a partir de n = 4 (A-B) o n = 3 (C) experimentos independientes. OZ: AAV sobredimensionado; OV: solapante de AAV dual; TS: transruptura de AAV dual; AP: AP híbrida de AAV dual; AK: AK híbrida de AAV dual; 5'+3': células coinfectadas con vectores de mitades 5' y 3'; 5': células control infectadas solo con la mitad 5' del vector; 3': células control infectadas solo con la mitad 3';  $\alpha$ -EGFP: anticuerpo anti-EGFP;  $\alpha$ -3xflag: anticuerpo anti-3xflag;  $\alpha$ -MYO7A: anticuerpo anti-MYO7A;  $\alpha$ - $\beta$ -tubulina: anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina;  $\alpha$ -filamina A: anticuerpo anti-filamina A. \* valor p de ANOVA <0,05; \*\* valor p de ANOVA < 0,001. (F): Los asteriscos mostrados en el panel inferior representan diferencias significativas con OZ y AP.

*Figura 3. Los vectores solapantes de AAV dual transducen el RPE pero no los fotorreceptores en la retina de ratón y de cerdo.*

Análisis de la transferencia Western de lisados retinianos de C57BL/6 (A) y de cerdo Large White (B) un mes después de la inyección de los vectores solapantes de AAV duales AAV2/8 que codifican los vectores ABCA4-3xflag (OV) o AAV2/8 que codifican EGFP de tamaño normal (EGFP) bajo el control del promotor de citomegalovirus ubicuo (CMV), los promotores de rodopsina (RHO) y de rodopsina quinasa (RHOK) específicos de PR, o el promotor de la distrofia macular viteliforme de tipo 2 (VMD2) específico de RPE. (A-B): Las flechas indican las proteínas de longitud completa, la escalera de peso molecular se indica a la izquierda y se cargaron 150 microgramos de proteínas en cada carril. Se muestra el número (n) y el porcentaje de retinas positivas a ABCA4 del total de retinas analizadas;  $\alpha$ -3xflag: anticuerpo anti-3xflag;  $\alpha$ -disferlina: anticuerpo anti-disferlina. (C): Análisis de la transferencia Western de copas oculares (panel izquierdo) y retinas (panel derecho) de C57/BL6 a los 3 meses tras la inyección de los vectores solapantes AAV2/8 para MYO7A-HA (OV) bajo el control del promotor de beta-actina de pollo ubicuo (CBA) o del promotor de rodopsina (RHO) específico de fotorreceptores. La flecha indica las proteínas de longitud completa, la escalera de peso molecular se indica a la izquierda y se cargaron 100 microgramos de proteínas en cada carril. Se muestra el número (n) y el porcentaje de retinas positivas a MYO7A de las retinas totales analizadas.  $\alpha$ -HA: anticuerpo anti-hemaglutinina (HA).

*Figura 4. Los vectores de transruptura y de AK híbrida de AAV duales transducen con eficacia el RPE y los fotorreceptores.*

Análisis de fluorescencia de criosecciones retinianas de ratones C57BL/6 un mes después de la inyección subretiniana de vectores AAV2/8 que codifican EGFP bajo el control del promotor de citomegalovirus ubicuo (CMV). En la figura se muestra la barra de escala (20  $\mu$ m). NS: AAV de tamaño normal; OZ: AAV sobredimensionado; TS: transruptura de AAV dual; AP: AP híbrida de AAV dual; AK: AK híbrida de AAV dual; RPE: epitelio pigmentario retiniano; ONL: capa nuclear externa.

*Figura 5. Los vectores de transruptura y de AK híbridas de AAV duales transducen con eficacia los fotorreceptores de ratón y de cerdo.*

(A): Análisis de fluorescencia de criosecciones retinianas de ratones C57BL/6 un mes después de la inyección subretiniana de vectores AAV2/8 que codifican EGFP bajo el control del promotor de rodopsina (RHO) específico de PR. En la figura se muestra la barra de escala (20  $\mu$ m). (B): Análisis de fluorescencia de criosecciones retinianas de cerdos Large White un mes después de la inyección subretiniana de vectores AAV2/8 que codifican EGFP bajo el control del promotor RHO específico de PR. En la figura se muestra la barra de escala (50  $\mu$ m). NS: AAV de tamaño normal; TS: transruptura de AAV dual; AK: AK híbrida de AAV dual; RPE: epitelio pigmentario retiniano; ONL: capa nuclear externa.

*Figura 6: La administración subretiniana de vectores de transruptura y de AK híbrida de AAV duales produce niveles robustos, aunque variables, de expresión de ABCA4 en fotorreceptores de ratón.*

(A): Análisis de la transferencia Western de lisados retinianos de C57BL/6 un mes después de la inyección de vectores de transruptura de AAV duales (TS) y de AK híbrida de AAV duales (AK) que codifican ABCA4 bajo el control del promotor de rodopsina (RHO) específico de PR. La flecha indica las proteínas de longitud completa, la escalera de peso molecular se indica a la izquierda y se cargaron 150 microgramos de proteínas en cada carril. Se muestra el número (n) y el porcentaje de retinas positivas a ABCA4 de las retinas totales analizadas. 5'+3': retinas coinyectadas con vectores de mitades 5' y 3';  $\alpha$ -3xflag: anticuerpo anti-3xflag;  $\alpha$ -disferlina: anticuerpo anti-disferlina. (B): Análisis con microscopía inmunoelectrónica con un anticuerpo anti-HA de secciones retinianas de ratones Balb/C de tipo salvaje (WT; n = 3 ojos) y *Abca4*<sup>-/-</sup> inyectados con vectores de AK híbrida de AAV duales (AK-ABCA4; n = 5 ojos) o con AAV de tamaño normal y EGFP (EGFP, n = 3 ojos) como control. Los puntos negros representan el inmunomarcaje con oro de la proteína ABCA4-HA. En la figura se muestra la barra de escala (200 nm).

*Figura 7. La inyección subretiniana de vectores de transruptura de AAV duales reduce la acumulación de gránulos de lipofuscina en ratones Abca4<sup>-/-</sup>.*

(A): Análisis con microscopía electrónica de transmisión de secciones retinianas de ratones Balb/c de tipo salvaje (WT) y *Abca4*<sup>-/-</sup> inyectados con vectores de AK híbrida de AAV duales (*Abca4*<sup>-/-</sup> AK-ABCA4) o con AAV de tamaño normal y EGFP (*Abca4*<sup>-/-</sup> EGFP) como control. Las flechas negras indican los gránulos de lipofuscina. En la figura se muestra la barra de escala (1,6  $\mu$ m). (B): Cuantificación del número promedio de gránulos de lipofuscina contados en al menos 30 campos (25  $\mu$ m<sup>2</sup>) para cada muestra. WT: ratones Balb/c; *Abca4*<sup>-/-</sup> EGFP/5'/3': ratones *Abca4*<sup>-/-</sup> inyectados con AAV de tamaño normal y EGFP o con el vector de la mitad 5' o 3' de AK híbrida de AAV dual, como control; *Abca4*<sup>-/-</sup> AK-ABCA4: ratones inyectados con vectores de AK híbrida de AAV duales; *Abca4*<sup>-/-</sup> TS-ABCA4: ratones inyectados con vectores de transruptura de AAV duales. Se muestra el número (n) de ojos analizados. El valor promedio se indica bajo la barra correspondiente. Barras de error: promedio  $\pm$  e.e.p. (error estándar del promedio). \* p de ANOVA < 0,05

*Figura 8: Las inyecciones subretinianas de vectores de AK híbrida de AAV duales reducen el espesor del RPE de Abca4<sup>-/-</sup>.*

(A): Fotografías representativas del análisis con microscopía electrónica de transmisión de secciones retinianas de ratones Balb/c de tipo salvaje (WT) y *Abca4*<sup>-/-</sup> inyectados con vectores de transruptura de AAV duales (TS-ABCA4) y de AK híbrida (AK-ABCA4) o con vectores de AAV de tamaño normal y EGFP (EGFP) y la mitad 5' o 3' de vectores de AK híbrida duales (5'/3') como control. Las líneas de puntos indican los bordes de las células del RPE. En la figura se muestra la barra de escala (3,8  $\mu$ m). (B): Cuantificación del espesor promedio del RPE contado en al menos 30 campos para cada muestra. Se muestra el número (n) de ojos analizados. El valor promedio se indica bajo la barra correspondiente. Barras de error: promedio  $\pm$  e.e.p. (error estándar del promedio). m.d.s.: WT:  $\pm$  716; TS-ABCA4:  $\pm$  698.

*Figura 9. La administración subretiniana de vectores de transruptura y de AK híbrida de AAV duales produce una expresión robusta de MYO7A en ratones.*

Análisis de la transferencia Western de copas oculares de C57BL/6 un mes después de la inyección de vectores de transruptura de AAV duales (TS) y de AK híbrida (AK) que codifican MYO7A-HA bajo el control del promotor de beta-actina de pollo ubicuo (CBA). La flecha indica las proteínas de longitud completa, la escalera de peso molecular se indica a la izquierda y se cargaron 100 microgramos de proteínas en cada carril. Se muestra el número (n) y el

porcentaje de copas oculares positivos a MYO7A de las retinas totales analizadas. 5'+3': ojos coinyectados con vectores de las mitades 5' y 3'; 5': ojos inyectados con vectores de la mitad 5'; 3': ojos inyectados con vectores de la mitad 3';  $\alpha$ -HA: anticuerpo anti-hemaglutinina (HA);  $\alpha$ -disferlina: anticuerpo anti-disferlina.

5 *Figura 10: La administración subretiniana de vectores de transruptura y de AK híbrida de AAV duales rescata la localización de los melanosomas en RPE de sh1-/-.*

10 (A): Secciones retinianas semidelgadas representativas teñidas con tinte de tejidos epoxi de ojos de *sh1+/+* y *sh1+/-* inyectados con AAV de tamaño normal y *EGFP* (*EGFP*, n = 4 ojos), y de ojos de *sh1-/-* inyectados con vectores de transruptura de AAV duales (TS-MYO7A, n = 3 ojos), de AK híbrida (AK-MYO7A; n = 3 ojos) o vectores de la mitad 5' (5'TS/5'AK, n = 4 ojos), como control. En la figura se muestra la barra de escala (10  $\mu$ m). (B): Cuantificación de la localización de los melanosomas en las vellosidades del RPE de ratones *sh1* dos meses después de la administración subretiniana de vectores de AAV duales. La cuantificación se muestra como el número promedio de melanosomas apicales/campo, y el valor promedio se indica bajo la barra correspondiente. Barras de error: promedio  $\pm$  e.e.p. (error estándar del promedio). \* p de ANOVA<0,05, \*\* p de ANOVA<0,001.

15 *Figura 11. La administración subretiniana de vectores de transruptura y de AK híbrida de AAV duales reduce la acumulación de rodopsina en los cilios conectores de PR de sh1-/-.*

Cuantificación del número de partículas de oro de rodopsina en los cilios conectores de PR de ratones *sh1* dos meses después de la administración subretiniana de vectores de AAV duales. La cuantificación se muestra como el número promedio de partículas de oro por longitud de cilios conectores (nm), y el valor promedio se indica bajo la barra correspondiente. Barras de error: promedio  $\pm$  e.e.p. (error estándar del promedio).

20 *Figura 12. Los vectores de transruptura y de AK híbrida de AAV duales transducen con eficacia el gen grande CEP290 in vitro.*

25 Análisis de la transferencia Western de células HEK293 infectadas con vectores AAV2/2 que codifican CEP290 marcada en su C-terminal con el marcador de hemaglutinina (HA) (A-B). (A): La flecha indica la proteína de longitud completa, se cargaron 60 microgramos de proteína en cada carril, y la escalera de peso molecular se indica a la izquierda. (B): Cuantificación de las bandas de proteína CEP290. La intensidad de las bandas de CEP290 se dividió entre la intensidad de las bandas de filamina A. El histograma muestra la expresión de las proteínas como un porcentaje relativo a los vectores de transruptura (TS) de AAV duales, y el valor promedio se indica bajo la barra correspondiente. Barras de error: promedio  $\pm$  e.e.p. (error estándar del promedio). La imagen de la transferencia Western es representativa y la cuantificación se realiza a partir de n = 5 experimentos independientes. OV: solapamiento de AAV duales; TS: transruptura de AAV duales; AK: AK híbrida de AAV dual; 5'+3': células coinfectadas con vectores de las mitades 5' y 3'; 3': células control infectadas solo con la mitad 3';  $\alpha$ -HA: anticuerpo anti-HA;  $\alpha$ -filamina A: anticuerpo anti-filamina A.

30

*Figura 13. Recuperación mejorada de la desensibilización a la luz en ratones de tres meses de edad Abca4-/- tratados con vectores de transruptura y de AK híbrida de AAV duales*

35 Recuperación de la desensibilización a la luz en ratones *Abca4-/-* y Balb/c 6 semanas después de la inyección. La onda b relativa es la proporción entre las amplitudes de onda b ( $\mu$ V) después y antes de la desensibilización, ambas evocadas por 1 cd s/m<sup>2</sup>. El tiempo (minutos) se refiere al tiempo después de la desensibilización. Se muestra el promedio de recuperación (%) a los 60 minutos. p de ANOVA *Abca4-/-* AK-ABCA4 frente *Abca4-/- no inyectado/5'*: 0,05; p de ANOVA *Abca4-/-* TS-ABCA4 frente a *Abca4-/- no inyectado/5'*: 0,009; p de ANOVA *Abca4-/-* AK-ABCA4 frente a WT: 0,002; p de ANOVA *Abca4-/-* TS-ABCA4 frente a WT: 0,02; p de ANOVA WT frente a *Abca4-/- no inyectado/5'*: 0,00001. WT: ratones Balb/c (n = 4); *Abca4-/-* TS-ABCA4: ratones inyectados con vectores de transruptura de AAV duales (n = 5); *Abca4-/-* AK-ABCA4: ratones inyectados con vectores de AK híbrida de AAV duales (n = 5); *Abca4-/- no inyectado/5'*: *Abca4-/-* ratones no inyectados (n = 2) o inyectados con la mitad 5' de vectores TS de AAV duales o de AK híbrida (n = 5). Los datos se muestran como promedio  $\pm$  e.e.p. (error estándar del promedio). \* p de ANOVA<0,05.

40

45

*Figura 14. Los vectores de AK híbrida de AAV duales inducen una expresión de MYO7A más potente que los vectores de transruptura de AAV duales en fotorreceptores de sh1-/-.*

50 Cuantificación de los niveles de MYO7A a partir de AAV duales en ojos de *sh1-/-* con relación a Myo7a endógena expresada en ojos de *sh1+/+*. Se inyectaron ojos de *sh1-/-* con vectores TS y de AK híbrida de AAV duales que codifican MYO7A bajo el control de los promotores de CBA (panel izquierdo) o RHO (panel derecho). Los histogramas muestran la expresión de la proteína MYO7A como un porcentaje relativo a Myo7a de *sh1+/+*; el valor promedio se indica bajo la barra correspondiente. La cuantificación se realiza mediante un análisis de la transferencia Western empleando el anticuerpo anti-MYO7A, y las mediciones de las intensidades de las bandas de MYO7A y Myo7a se normalizaron a la disferlina (los datos no se muestran). Barras de error: promedio  $\pm$  d.e.p. (desviación estándar del promedio). La cuantificación es representativa de: i. panel izquierdo: n = 2 copas oculares de *sh1+/+*, y n = 5 o n = 1 copa ocular de *sh1-/-* tratadas con TS-MYO7A o AK-MYO7A, respectivamente; ii. panel derecho: n = 2 retinas de *sh1+/+*, y n = 1 o n = 3 retinas de *sh1-/-* tratadas con TS-MYO7A o AK-MYO7A, respectivamente. \*\* p del ensayo de la t de Student <0,001.

55

*Figura 15. Los vectores de AAV de tamaño normal, de transruptura y de AK híbrida de AAV duales proporcionan la transducción más robusta tras una administración subretiniana en ratones.*

5 Imágenes en vivo de la fluorescencia del fondo del ojo de C57BL/6 un mes después de la inyección subretiniana de vectores AAV2/8 que codifican EGFP. NZ: tamaño normal; OZ: AAV sobredimensionados; TS: transruptura de AAV dual; AP: AP híbrida de AAV dual; AK: AK híbrida de AAV dual. Cada panel muestra un ojo diferente.

*Figura 16. Expresión robusta de ABCA4 y MYO7A después de la administración de vectores de transruptura y de AK híbrida de AAV duales a la retina de cerdos.*

10 (a) Análisis de la transferencia Western de lisados retinianos de cerdos Large White 1 mes después de la inyección de vectores de transruptura (TS; n = 2) y de AK híbrida (AK; n = 3) de AAV2/8 duales que codifican ABCA4-3xflag, o de vectores AAV2/8 que codifican NS EGFP (neg), como control negativo, bajo el control del promotor de rodopsina (RHO) específico de fotorreceptores. (b) Análisis de la transferencia Western de lisados retinianos de cerdos Large White 1 mes después de la inyección de vectores de transruptura (TS: n = 5 RPE; n = 3 retinas) y de AK híbrida (AK: n = 5 RPE, n = 5 retinas) de AAV2/8 duales que codifican MYO7A-HA bajo el control del promotor de beta-actina de pollo ubicuo (CBA), o de la mitad 3' de AAV-MYO7AHA dual (neg), como control negativo. (a-b): Las flechas indican las proteínas de longitud completa, la escalera de peso molecular se indica a la izquierda y se cargaron 150-180 µg de proteínas en cada carril. α-3xflag, anticuerpo anti-3xflag; α-HA, anticuerpo anti-hemaglutinina; α-disferlina, anticuerpo anti-disferlina.

*Figura 17. Los vectores de AK híbrida de AAV duales con ITR heterólogas transducen genes grandes in vitro.*

20 (a) Diseño de los vectores de AK híbrida de AAV duales con ITR2 y ITR5 heterólogas. (b) Análisis de la transferencia Western de células HEK293 infectadas con vectores de AK híbrida de AAV duales con ITR heterólogas que codifican ABCA4 (panel izquierdo) y MYO7A (panel derecho). Las flechas indican las proteínas de longitud completa, se cargaron 50 microgramos de proteína, y la escalera de peso molecular se indica a la izquierda. 5'+3': células coinfectadas con vectores de las mitades 5' y 3'; 5': células control infectadas solo con el vector de la mitad 5'; 3': células control infectadas solo con el vector de la mitad 3'; neg: células infectadas con vectores AAV2/8 que codifican EGFP. α-3xflag: anticuerpo anti-3xflag; α-MYO7A: anticuerpo anti-MYO7A; α-filamina: anticuerpo anti-filamina A. (a) Prom: promotor; CDS: secuencia codificadora; pA: señal de poliadenilación; SD: señal donante de ruptura; SA: señal aceptora de ruptura; las líneas de puntos muestran las regiones solapantes disponibles para la recombinación homóloga, y las líneas discontinuas muestran la ruptura que se produce entre SD y SA. Se muestra la posición de las ITR2 y ITR5 heterólogas.

### 30 Descripción detallada de la invención

Materiales y métodos

*Generación de plásmidos de vector de AAV*

Los plásmidos utilizados para la producción del vector de AAV se derivaron de los plásmidos pZac2.1 (52) o pAAV2.1 (53) que contienen las repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV de serotipo 2 (tabla 1).

35

Tabla 1 - Plásmidos para la producción del vector de AAV

	Plásmido	Tamaño de ITR- ITR (pb)	Serotipo de AAV	
			2/2	2/8
Tamaño normal (NS)	pZac2.1-CMV-EGFP-SV40	3006	X	X
	pZac2.1-RHO-EGFP-SV40	2900		X
Sobredimensionado (OZ)	pAAV2.1-CMV-EGFP-9.9-BGH	9951	X	X
	pZac2.1-CMV-ABCA4_3xflag-SV40	8619	X	
	pAAV2.1-CBA-MYO7A_HA-BGH	8220	X	
Solapante (OV)	pZac2.1-CMV-ABCA4_5'	4900	X	X
	pZac2.1-RHO-ABCA4_5'	4805		X
	pZac2.1-RHOK-ABCA4_5'	4169		X
	pZac2.1-VMD2-ABCA4_5'	4658		X
	pAAV2.1-CBA-MYO7A_5'	4708	X	X
	pAAV2.1-RHO-MYO7A_5'	4699		X

	Plásmido	Tamaño de ITR- ITR (pb)	Serotipo de AAV	
			2/2	2/8
	pZac2.1- <i>ABCA4</i> _3'_3xflag_SV40	4740	X	X
	pAAV2.1- <i>MYO7A</i> _3'_HA_BGH	4655	X	X
Transruptura (TS)	pZac2.1-CMV- <i>ABCA4</i> _5'TS	4431	X	
	pZac2.1-RHO- <i>ABCA4</i> _5'TS	4321		X
	pZac2.1- <i>ABCA4</i> _3'TS_3xflag_SV40	4587	X	X
	pAAV2.1-CBA- <i>MYO7A</i> _5'TS	4468	X	X
	pAAV2.1-RHO- <i>MYO7A</i> _5'TS	4459		X
	pAAV2.1- <i>MYO7A</i> _3'TS_HA_BGH	4298	X	X
	pZac2.1-CMV- <i>EGFP</i> _5'TS	1906	X	X
	pZac2.1-RHO- <i>EGFP</i> _5'TS	1802		X
	pZac2.1- <i>EGFP</i> _3'TS_SV40	1510	X	X
AP híbrida (AP)	pZac2.1-CMV- <i>ABCA4</i> _5'AP	4708	X	
	pZac2.1- <i>ABCA4</i> _3'AP_3xflag_SV40	4871	X	
	pAAV2.1-CBA- <i>MYO7A</i> _5'AP	4746	X	
	pAAV2.1- <i>MYO7A</i> _3'AP_HA_BGH	4576	X	
	pZac2.1-CMV- <i>EGFP</i> _5'AP	2183	X	X
	pZac2.1- <i>EGFP</i> _3'AP_SV40	1783	X	X
AK híbrida (AK)	pZac2.1-CMV- <i>ABCA4</i> _5'AK	4540	X	
	pZac2.1 (ITR5:2)-CMV- <i>ABCA4</i> _5'AK	4604	X	
	pZac2.1-RHO- <i>ABCA4</i> _5'AK	4436		X
	pZac2.1- <i>ABCA4</i> _3'AK_3xflag_SV40	4702	X	X

Plásmido	Tamaño de ITR- ITR (pb)	Serotipo de AAV	
		2/2	2/8
pZac2.1 (ITR2:5)- <i>ABCA4</i> _3'AK_3xflag_SV40	5192	X	
pZac2.1- <i>ABCA4</i> _3'AK_HA_SV40	4663		X
pAAV2.1-CBA- <i>MYO7A</i> _5'AK	4577	X	X
pAAV2.1 (ITR5:2)-CBA- <i>MYO7A</i> _5'AK	4503	X	
pAAV2.1-RHO- <i>MYO7A</i> _5'AK	4568		X
pAAV2.1- <i>MYO7A</i> _3'AK_HA_BGH	4421	X	X
pAAV2.1 (ITR2:5)- <i>MYO7A</i> _3'AK_HA_BGH	4386	X	
pZac2.1-CMV-EGFP _5'AK	2015	X	X
pZac2.1-RHO-EGFP _5'AK	1911		X
pZac2.1-EGFP _3'AK_SV40	1614	X	X

N.B. CMV: promotor de citomegalovirus; CBA: beta-actina de pollo; RHO: promotor de rodopsina humano; RHOK: promotor de rodopsina quinasa humano; Vmd2: promotor de la distrofia macular viteliforme de tipo 2; EGFP: proteína fluorescente verde potenciada; ABCA4: módulo de unión a ATP humano, subfamilia A, miembro 4; MYO7A: miosina VIIA humana; SV40: señal de poliadenilación del virus de simio 40; BGH: señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina; 3xflag: marcador 3xflag; HA: marcador de hemaglutinina; AP: región recombinogénica de la fosfatasa alcalina; AK: región recombinogénica del fago F1; TS: transruptura; ITR5:2: plásmido con la ITR izquierda del AAV de serotipo 5 y la ITR derecha del AAV de serotipo 2; ITR2:5: plásmido con la ITR izquierda del AAV de serotipo 2 y la ITR derecha del AAV de serotipo 5. Cuando no se especifica, la ITR izquierda y derecha proceden del AAV de serotipo 2.

Los plásmidos de vector de AAV de tamaño normal y sobredimensionado contienen módulos de expresión de longitud completa que incluyen el promotor, la CDS del transgén de longitud completa y la señal de poliadenilación (pA) (tabla 1). Los dos plásmidos de vector de AAV distintos (5' y 3') necesarios para generar vectores de AAV duales contienen el promotor seguido de la porción N-terminal de la CDS del transgén (plásmido 5') o la porción C-terminal de la CDS del transgén seguida de la señal de pA (plásmido 3', tabla 1). Los plásmidos de EGFP de tamaño normal se generaron clonando la CDS de EGFP del plásmido pAAV2.1-CMV-EGFP (720 pb) (53) en pZac2.1 (52); el EGFP sobredimensionado se generó a partir de pAAV2.1-CMV-EGFP (53) mediante la inserción de una secuencia de ADN de relleno de 3632 pb procedente de *ABCA4* humana (NM\_000350.2, pb 1960-5591) cadena arriba del promotor de CMV y una segunda secuencia de ADN de relleno de 3621 pb, compuesta de: *ABCA4* murina (NM 007378.1, 1066-1 y 7124-6046 pb; 2145 pb totales) y harmonina humana (NM153676.3 131-1606 pb; 1476 pb totales), cadena abajo de la señal de pA (esta construcción se usa en los experimentos de la figura 1a, d, figura 4 y figura 15). Para generar los plásmidos de vector de AAV duales, la CDS de EGFP (720 pb) se dividió en dos construcciones: una que contiene la CDS N-terminal (PMID: 9759496, pb 1-393) y la otra que contiene la CDS C-terminal (PMID: 9759496, pb 394-720).

Los plásmidos de *ABCA4* sobredimensionados contienen la CDS de *ABCA4* humana de longitud completa (GeneNM\_000350.2, pb 105-6926), mientras que los plásmidos de *MYO7A* sobredimensionados contienen la CDS de *MYO7A* humana de longitud completa procedente de la isoforma 1 (NM\_000260.3, pb 273-6920). Para generar los plásmidos para los vectores de AAV OV, las CDS de *ABCA4* y *MYO7A* se dividieron en dos construcciones, una

que contiene el N-terminal de CDS (*ABCA4*: NM\_000350.2, pb 105-3588; *MYO7A*: NM\_000350.2, pb 273-3782) y la otra que contiene el C-terminal de CDS (*ABCA4*: NM\_000350.2, pb 2819-6926; *MYO7A*: NM\_000350.2, pb 2913-6920). Por tanto, la región de homología compartida por los plásmidos de vector solapante es de 770 pb para *ABCA4* y de 870 pb para *MYO7A*. Para generar los plásmidos para los vectores de AAV OV duales, la CDS de CEP290 humana se dividió en dos construcciones, una que contiene el N-terminal de CDS (CEP290: NM\_025114, pb 345-4076) y la otra que contiene el C-terminal de CDS (CEP290: NM\_025114, pb 3575-7784). Por tanto, la región de homología compartida por los plásmidos de vector solapante es de 502 pb.

Para generar plásmidos de vector de transruptura e híbridos, las CDS de *ABCA4* y *MYO7A* se dividieron en una zona de unión exón-exón natural. *ABCA4* se dividió entre los exones 19-20 (mitad 5': NM\_000350.2, 105-3022 pb; mitad 3': NM\_000350.2, pb 3023-6926) y *MYO7A* se dividió entre los exones 24-25 (mitad 5': NM\_000350.2, pb 273-3380; mitad 3': NM\_000350.2, pb 3381-6926). Las proteínas *ABCA4* y *MYO7A* se marcaron en su C-terminal: *ABCA4* con el marcador 3xflag (gactacaagaccatgacgggtgattataaagatcatgacatcgactacaaggatgacgatgacaag) o hemaglutinina (HA) tag (tatccgtatgatgtgccggattatgcg); *MYO7A* solo con el marcador HA. Para generar plásmidos de vector de transruptura e híbridos, la CDS de CEP290 se dividió en una zona de unión exón-exón natural: entre los exones 29-30 (mitad 5': NM\_025114, 345-3805; mitad 3': NM\_025114, 3806-7784). La proteína CEP290 se marcó en su C-terminal con el marcador hemaglutinina (HA). Las señales donante de ruptura (SD) y aceptora de ruptura (SA) contenidas en los plásmidos de vector de AAV dual de transruptura e híbrido son las siguientes:

5'GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGTTTAAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCT-3' (SD) SEQ ID NO:1;

5'GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG-3' (SA), SEQ ID NO:2.

La secuencia recombinogénica contenida en los plásmidos de vector de AP híbrida (presente en el primer y segundo plásmido) se deriva de los genes de la fosfatasa alcalina (AP) (NM\_001632, pb 823-1100), tal como se ha descrito previamente (39). La secuencia recombinogénica contenida en los plásmidos de vector de AK híbrida (presente en el primer y segundo plásmido) se deriva del genoma del fago F1 (n.º de registro de Gene Bank: J02448.1; pb 5850-5926).

La secuencia de AK es:

5'GGGATTTTGCCGATTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAT-3', SEQ ID NO:3.

El promotor de CMV es el que está contenido en pZac2.1 (52) o pAAV2.1-CMV-EGFP (53); el promotor de CBA ubicuo se deriva de pAAV2.1-CBA-EGFP (11); los promotores de RHO y RHOK humanos específicos de PR se derivan de pAAV2.1-RHO-EGFP y pAAV2.1RHOK-EGFP, respectivamente (10); el promotor de Vmd2 específico de RPE (NG\_009033.1, 4870-5470 pb) se corresponde con el fragmento del promotor de EcoRI-XcmI previamente descrito (41) que fue amplificado por ADN genómico humano.

Para generar los vectores de AK híbrida de AAV duales con ITR heterólogas procedentes de AAV del serotipo 2 y 5 se intercambiaron la ITR2 izquierda de la mitad 5' del plásmido y la ITR2 derecha de la mitad 3' del plásmido por la ITR5 (según se muestra en la figura 17a). Los plásmidos para la producción de los vectores AAV2 con ITR heterólogas son los siguientes: pZac5:2-CMV-5'*ABCA4*-SD-AK, pZac2:5-AK-SD-3'*ABCA4*-3xflag, pAAV5:2-CBA-5'*MYO7A*-SD-AK y pAAV2:5-AK-SD-3'*MYO7A*-HA (tabla 1).

Secuencias:

**Gen *ABCA4***

**pZac2.1-CMV-*ABCA4*\_5'AK**

**ITR2 izquierda**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTTCT (SEQ ID No. 4)

**ITR5 izquierda**

CTCTCCCCCTGTTCGCGTTTCGCTCGCTCGCTGGCTCGTTTGGGGGGTGGCAGCTCAAAGAGCTGCCAGACGACGGCCCTCTGGCCGTCGCCCCCAAACGAGCCAGCGAGCGAGCGAACGCGACAGGGGGGAGAGTGCCCACTCTCAAGCAAGGGGGTTTTGTAAAGCAGTGA (SEQ ID No. 5)



**Potenciador de CMV**

TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAAATCAATATTGGCTATT  
GGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATA  
TGACCGCCATGTTGGCATTGATTATTGAC (SEQ ID No. 6)

**Promotor de CMV**

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCG  
TTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACG  
TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGT  
GGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGC  
CCCCATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTA  
CGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCG  
GTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCC  
ACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAATGT  
CGTAATAACCCCGCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATAT  
AAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGT (SEQ ID No. 7)

**5 Intrón quimérico**

GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTCGAGACA  
GAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTC  
TCTCCACAG (SEQ ID No. 8)

**Abca4 5'**

ATGGGCTTCGTGAGACAGATACAGCTTTTGTCTCTGGAAGAACTGGACCCTGCGGAAAAGGCA  
AAAGATTCGCTTTGTGGTGGAACCTCGTGTGGCCTTTATCTTTATTTCTGGTCTTGATCTGGT  
TAAGGAATGCCAACCCGCTCTACAGCCATCATGAATGCCATTTCCCAACAAGCGGATGCC  
TCAGCAGGAATGCTGCCGTGGCTCCAGGGGATCTTCTGCAATGTGAACAATCCCTGTTTTCA  
AAGCCCCACCCAGGAGAATCTCCTGGAATTGTGTCAAACCTATAACAACCTCCATCTTGGCAA  
GGGTATATCGAGATTTTCAAGAACTCCTCATGAATGCACCAGAGAGCCAGCACCTTGGCCGT  
ATTTGGACAGAGCTACACATCTTGTCCCAATTCATGGACACCCTCCGGACTCACCCGGAGAG  
AATTGCAGGAAGAGGAATTCGAATAAGGGATATCTTGAAAGATGAAGAAACACTGACACTAT  
TTCTCATTA AAAACATCGGCCTGTCTGACTCAGTGGTCTACCTTCTGATCAACTCTCAAGTC  
CGTCCAGAGCAGTTCGCTCATGGAGTCCCGGACCTGGCGCTGAAGGACATCGCCTGCAGCGA  
GGCCCTCCTGGAGCGCTTCATCATCTTCAGCCAGAGACGCGGGGCAAAGACGGTGCCTATG  
CCCTGTGCTCCCTCTCCAGGGCACCTACAGTGGATAGAAGACACTCTGTATGCCAACGTG  
GACTTCTTCAAGCTCTTCCGTGTGCTTCCCACACTCCTAGACAGCCGTTCTCAAGGTATCAA  
TCTGAGATCTTGGGGAGGAATATTATCTGATATGTCACCAAGAATTCAAGAGTTTATCCATC  
GGCCGAGTATGCAGGACTTGCTGTGGGTGACCAGGCCCTCATGCAGAATGGTGGTCCAGAG  
ACCTTTACAAAGCTGATGGGCATCCTGTCTGACCTCCTGTGTGGCTACCCCGAGGGAGGTGG  
CTCTCGGGTGTCTCCTTCAACTGGTATGAAGACAATAACTATAAGGCCTTTCTGGGGATTG  
ACTCCACAAGGAAGGATCCTATCTATCTTATGACAGAAGAACAACATCCTTTTGTAAATGCA  
TTGATCCAGAGCCTGGAGTCAAATCCTTTAACCAAAATCGCTTGGAGGGCGGCAAAGCCTTT  
GCTGATGGGAAAATCCTGTACACTCCTGATTACCTGCAGCACGAAGGATACTGAAGAATG  
CCAACCTCAACTTTTGAAGAACTGGAACACGTTAGGAAGTTGGTCAAAGCCTGGGAAGAAGTA  
GGGCCCCAGATCTGGTACTTCTTTGACAACAGCACACAGATGAACATGATCAGAGATACCCT  
GGGGAACCCAACAGTAAAAGACTTTTTGAAATAGGCAGCTTGGTGAAGAAGGTATTACTGCTG  
AAGCCATCCTAAACTTCTCTACAAGGGCCCTCGGGAAAGCCAGGCTGACGACATGGCCAAC  
TTCGACTGGAGGGACATATTTAACATCACTGATCGCACCCCTCCGCTTGTCAATCAATACCT  
GGAGTGCTTGGTCTGGATAAGTTTTGAAAGCTACAATGATGAAACTCAGCTCACCCAACGTG

CCCTCTCTCTACTGGAGGAAAACATGTTCTGGGCGGAGTGGTATTCCCTGACATGTATCCC  
TGGACCAGCTCTCTACCACCCACCGTGAAGTATAAGATCCGAATGGACATAGACGTGGTGG  
GAAAACCAATAAGATTAAAGACAGGTATTGGGATTCTGGTCCCAGAGCTGATCCCCTGGAAG  
ATTTCCGGTACATCTGGGGCGGGTTGCCATCTGCAGGACATGGTTGAACAGGGGATCACA  
AGGAGCCAGGTGCAGGCGGAGGCTCCAGTTGGAATCTACCTCCAGCAGATGCCCTACCCCTG  
CTTCGTGGACGATTCTTTCATGATCATCCTGAACCGCTGTTTCCCTATCTTCATGGTGTGG  
CATGGATCTACTCTGTCTCCATGACTGTGAAGAGCATCGTCTTGAGAAGGAGTTGCGACTG  
AAGGAGACCTTGAAAAATCAGGGTGTCTCCAATGCAGTGATTTGGTGTACCTGGTTCCTGGA  
CAGCTTCTCCATCATGTGATGAGCATCTTCCCTCCTGACGATATTCATCATGCATGGAAGAA  
TCCTACATTACAGCGACCCATTCATCCTCTTCCCTGTTCTTGTGGCTTCTCCACTGCCACC  
ATCATGCTGTGCTTTCTGCTCAGCACCTTCTTCTCCAAGGCCAGTCTGGCAGCAGCCTGTAG  
TGGTGTATCTATTTACCCCTCTACCTGCCACACATCCTGTGCTTCGCCTGGCAGGACCGCA  
TGACCGCTGAGCTGAAGAAGGCTGTGAGCTTACTGTCTCCGGTGGCATTGGATTTGGCACT  
GAGTACCTGGTTTCGCTTTGAAGAGCAAGGCCGGGGCTGCAGTGGAGCAACATCGGGAACAG  
TCCCACGGAAGGGGACGAATTCAGCTTCCCTGCTGTCCATGCAGATGATGCTCCTTGATGCTG  
CTGTCTATGGCTTACTCGCTTGGTACCTTGATCAGGTGTTTCCAGGAGACTATGGAACCCCA  
CTTCCCTTGGTACTTTCTTCTACAAGAGTCGATTGGCTTGGCGGTGAAGGGTGTTC AACCCAG  
AGAAGAAAGAGCCCTGGAAGAGACCGAGCCCTAACAGAGGAAACGGAGGATCCAGAGCACC  
CAGAAGGAATACACGACTCCTTCTTTGAACGTGAGCATCCAGGGTGGGTTCCTGGGGTATGC  
GTGAAGAACTGGTAAAGATTTTTGAGCCCTGTGGCCGGCCAGCTGTGGACCGTCTGAACAT  
CACCTTCTACGAGAACCAGATCACCCGATTCCTGGGCCACAATGGAGCTGGGAAAACCCCA  
CCTT (SEQ ID No. 9)

**Señal donante de ruptura**

GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGCGAGACA  
GAGAAGACTCTTGCCTTTCT (SEQ ID No. 1)

**AK**

5 GGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC  
GAATTTTAACAAAAT (SEQ ID No. 3)

**ITR2 derecha (o 5' ITR2)**

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC  
GGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC  
GCGCAG (SEQ ID No. 10)

**Secuencia de longitud completa de pZac2.1-CMV-ABCA4\_5'AK**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG  
TCGCCCGGCCCTCAGTGAGCGGAGCGGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGG  
GTTCCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAG  
ATCTTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCAATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGC  
TATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCC  
AATATGACCGCCATGTTGGCATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGT  
CATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCT  
GGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC  
GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG  
CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGG  
CCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTA  
CGTATTAGTTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGAT  
AGCGGTTTACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGT

TGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAAT  
 GGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGA  
 TCACTAGAAGCTTTATTGCGGTAGTTTATCACAGTTAAATTTGCTAACGCAGTCAGTGCTTCT  
 GACACAACAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTAT  
 CAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGAC  
 TCTTGCGTTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACA  
 GGTGTCCACTCCCAGTTCAATTACAGCTCTTAAGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATA  
 GGCTAGCCTCGAGAATTCACGCGTGGTACCTCTAGAGTCGACCCGGGCGGCCCATGGGCT  
 TCGTGAGACAGATACAGCTTTTGTCTGGAAGAAGTGGACCCTGCGGAAAAGGCAAAAAGATT  
 CGCTTTGTGGTGGAAGTTCGTGTGGCCTTTATCTTTATTTCTGGTCTTGATCTGGTTAAGGAA  
 TGCCAAACCGCTCTACAGCCATCATGAATGCCATTTCCCAACAAGGCGATGCCCTCAGCAG  
 GAATGCTGCCGTGGCTCCAGGGGATCTTCTGCAATGTGAACAATCCCTGTTTTTCAAAGCCCC  
 ACCCCAGGAGAATCTCCTGGAATTGTGTCAAACCTATAACAACCTCCATCTTGGCAAGGGTATA  
 TCGAGATTTTTCAAGAAGTCCCTCATGAATGCACCAGAGAGCCAGCACCTTGGCCGTATTTGGA  
 CAGAGCTACACATCTTGTCCCAATTCATGGACACCCTCCGGACTCACCCGGAGAGAATTTGCA  
 GGAAGAGGAATTCGAATAAGGGATATCTTGAAAGATGAAGAAACACTGACACTATTTCTCAT  
 TAAAAACATCGGCCTGTCTGACTCAGTGGTCTACCTTCTGATCAACTCTCAAGTCCGTCCAG  
 AGCAGTTTCGTCTATGGAGTCCCGGACCTGGCGCTGAAGGACATCGCCTGCAGCGAGGCCCTC  
 CTGGAGCGCTTCATCATCTTCAGCCAGAGACCGGGGCAAAGACGGTGCCTATGCCCTGTG  
 CTCCCTCTCCAGGGCACCTACAGTGGATAGAAGACACTCTGTATGCCAACGTGGACTTCT  
 TCAAGCTCTTCCGTGTGCTTCCACACTCCTAGACAGCCGTCTCAAGGTATCAATCTGAGA  
 TCTTGGGGAGGAATATTATCTGATATGTCACCAAGAATTCAGAGTTTATCCATCGGCCGAG  
 TATGCAGGACTTGCTGTGGGTGACCAGGCCCTCATGCAGAATGGTGGTCCAGAGACCTTTA  
 CAAAGCTGATGGGCATCCTGTCTGACCTCCTGTGTGGCTACCCCGAGGGAGGTGGCTCTCGG  
 GTGCTCTCCTTCAACTGGTATGAAGACAATAACTATAAGGCCTTTCTGGGGATTGACTCCAC  
 AAGGAAGGATCCTATCTATTCTTATGACAGAAGAACAACATCCTTTTTGTAATGCATTGATCC  
 AGAGCCTGGAGTCAAATCCTTTAACCAAAATCGCTTGGAGGGCGGCAAAGCCTTTGCTGATG  
 GGAAAAATCCTGTACACTCCTGATTCACCTGCAGCACGAAGGATACTGAAGAATGCCAACTC  
 AACTTTTGAAGAAGTGAACACGTTAGGAAGTTGGTCAAAGCCTGGGAAGAAGTAGGGCCCC  
 AGATCTGGTACTTCTTTGACAACAGCACACAGATGAACATGATCAGAGATACCCTGGGGAAC  
 CCAACAGTAAAAGACTTTTTGAAATAGGCAGCTTGGTGAAGAAGGTATTTACTGCTGAAGCCAT  
 CCTAAACTTCTCTACAAGGGCCCCCGGGAAAGCCAGGCTGACGACATGGCCAACCTTCGACT  
 GGAGGGACATATTTAACATCACTGATCGCACCCCTCCGCCTTGTCAATCAATACCTGGAGTGC  
 TTGGTCTGGATAAGTTTTGAAAGCTACAATGATGAAACTCAGCTCACCCAACGTGCCCTCTC  
 TCTACTGGAGGAAAACATGTTCTGGGCCGGAGTGGTATTCCTGACATGTATCCCTGGACCA  
 GCTCTTACCACCCACGTGAAGTATAAGATCCGAATGGACATAGACGTGGTGGAGAAAACC  
 AATAAGATTAAAGACAGGTATTGGGATTCTGGTCCCAGAGCTGATCCCGTGGAAAGATTTCCG  
 GTACATCTGGGGCGGGTTTGCTATCTGCAGGACATGGTTGAACAGGGGATCACAAGGAGCC  
 AGGTGCAGGCGGAGGCTCCAGTTGGAATCTACCTCCAGCAGATGCCCTACCCCTGCTTCGTG  
 GACGATTTTTCATGATCATCCTGAACCGCTGTTTCCCTATCTTCATGGTGTGCTGGCATGGAT  
 CTACTCTGTCTCCATGACTGTGAAGAGCATCGTCTTGGAGAAGGAGTTGCGACTGAAGGAGA  
 CCTTGAAAAATCAGGGTGTCTCCAATGCAGTGATTTGGTGTACCTGGTTCTTGGACAGCTTC  
 TCCATCATGTGATGAGCATCTTCCCTCCTGACGATATTCATCATGCATGGAAGAATCCTACA  
 TTACAGCGACCCATTCATCCTCTTCTGTTCTTGTGGCTTTCTCCACTGCCACCATCATGC  
 TGTGCTTTCTGCTCAGCACCTTCTTCTCCAAGGCCAGTCTGGCAGCAGCCTGTAGTGGTGTC  
 ATCTATTTTACCCTCTACCTGCCACACATCCTGTGCTTCGCCTGGCAGGACCGCATGACCGC  
 TGAGCTGAAGAAGGCTGTGAGCTTACTGTCTCCGGTGGCATTTGGATTTGGCACTGAGTACC  
 TGGTTTCGCTTTGAAGAGCAAGGCCTGGGGCTGCAGTGGAGCAACATCGGGAACAGTCCCACG  
 GAAGGGGACGAATTCAGCTTCTGCTGTCCATGCAGATGATGCTCCTTGATGCTGCTGTCTA  
 TGGCTTACTCGCTTGGTACCTTGATCAGGTGTTTTCCAGGAGACTATGGAACCCCACTTCTTT  
 GGTACTTTCTTCTACAAGAGTTCGTATTGGCTTGGCGGTGAAGGGTGTTCACCCAGAGAAGAA

AGAGCCCTGGAAAAGACCGAGCCCCTAACAGAGGAAACGGAGGATCCAGAGCACCCAGAAGG  
 AATACACGACTCCTTCTTTGAACGTGAGCATCCAGGGTGGGTTCCTGGGGTATGCGTGAAGA  
 ATCTGGTAAAGATTTTTGAGCCCTGTGGCCGGCCAGCTGTGGACCGTCTGAACATCACCTTC  
 TACGAGAACCAGATCACCGCATTCTGGGCCACAATGGAGCTGGGAAAACCACCACCTTGTA  
 AGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTTCGAGACAGAG  
 AAGACTCTTGCCTTTCTGGGATTTTCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATT  
 TAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTATAATTTTCAGGTGGCATCTT  
 TCCAATTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA  
 CTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGC  
 GAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID No. 11)

**pZac2.1-ABCA4\_3'AK\_SV40**

**ITR2 izquierda**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCGGGCGACCTTTGG  
 TCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGG  
 GTTCCT (SEQ ID No. 4)

5 **AK**

GGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC  
 GAATTTTAACAAAAT (SEQ ID No. 3)

**Señal aceptora de ruptura**

GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG (SEQ ID NO:2)

**Abca4\_3'**

GTCCATCCTGACGGGTCTGTTGCCACCAACCTCTGGGACTGTGCTCGTTGGGGGAAGGGACA  
 TTGAAACCAGCCTGGATGCAGTCCGGCAGAGCCTTGGCATGTGTCCACAGCACAACATCCTG  
 TTCCACCACCTCACGGTGGCTGAGCACATGCTGTTCTATGCCAGCTGAAAGGAAAGTCCCA  
 GGAGGAGGCCAGCTGGAGATGGAAGCCATGTTGGAGGACACAGGCCTCCACCACAAGCGGA  
 ATGAAGAGGCTCAGGACCTATCAGGTGGCATGCAGAGAAAGCTGTCCGTTGCCATTGCCTTT  
 GTGGGAGATGCCAAGGTGGTGAATCTTGACGAAACCCACCTCTGGGGTGGACCCTTACTCGAG  
 ACCGCTCAATCTGGGATCTGCTCCTGAAGTATCGCTCAGGCAGAACCATCATCATGTCCACTC  
 ACCATGGACGAGGCCGACCTCCTTGGGGACCGCATTGCCATCATTGCCAGGGAAGGCTC  
 TACTGCTCAGGCACCCCACTTCTCCTGAAGAAGTGTCTTGGCACAGGCTTGTACTTAACCTT  
 GGTGCGCAAGATGAAAAACATCCAGAGCCAAAGGAAAGGCAGTGAGGGGACCTGCAGCTGCT  
 CGTCTAAGGGTTTTCTCCACCACGTGTCCAGCCACGTTCGATGACCTAACTCCAGAACAAGTC  
 CTGGATGGGGATGTAATGAGCTGATGGATGTAGTTCTCCACCATGTTCCAGAGGCAAAGCT  
 GGTGGAGTGCATTGGTCAAGAACTTATCTTCTTCTTCCAAATAAGAACTTCAAGCACAGAG  
 CATATGCCAGCCTTTTTCAGAGAGCTGGAGGAGACGCTGGCTGACCTTGGTCTCAGCAGTTTT  
 GGAATTTCTGACACTCCCCTGGAAGAGATTTTTCTGAAGGTCACGGAGGATTCTGATTTCAGG  
 ACCTCTGTTTGCGGGTGGCGCTCAGCAGAAAAGAGAAAACGTCAACCCCGACACCCCTGCT  
 TGGGTCCCAGAGAGAAGGCTGGACAGACACCCAGGACTCCAATGTCTGCTCCCCAGGGGCG  
 CCGGCTGCTCACCCAGAGGGCCAGCCTCCCCAGAGCCAGAGTGCCAGGCCCCGACGCTCAA  
 CACGGGGACACAGCTGGTCCCTCCAGCATGTGCAGGCGCTGCTGGTCAAGAGATTCCAACACA  
 CCATCCGCAGCCACAAGGACTTCTTGGCGCAGATCGTGCTCCCGGCTACCTTTGTGTTTTTG  
 GCTCTGATGCTTTCTATTGTTATCCCTCCTTTTGGCGAATAACCCGCTTTGACCCTTCAACC  
 CTGGATATATGGGCAGCAGTACACCTTCTTTCAGCATGGATGAACCAGGCAGTGAGCAGTTCA  
 CGGTACTTGCAGACGTCCTCCTGAATAAGCCAGGCTTTGGCAACCGCTGCCTGAAGGAAGGG  
 TGGCTTCCGGAGTACCCCTGTGGCAACTCAACACCCTGGAAGACTCCTTCTGTGTCCCCAAA

10

CATCACCAGCTGTTCCAGAAGCAGAAATGGACACAGGTCAACCCTTCACCATCCTGCAGGT  
 GCAGCACCAGGGAGAAGCTCACCATGCTGCCAGAGTGCCCCGAGGGTGCCGGGGGCCTCCCC  
 CCCCCCAGAGAACACAGCGCAGCACGGAAATTCTACAAGACCTGACGGACAGGAACATCTC  
 CGACTTCTTGGTAAAAACGTATCCTGCTCTTATAAGAAGCAGCTTAAAGAGCAAATTCTGGG  
 TCAATGAACAGAGGTATGGAGGAATTTCCATTGGAGGAAAGCTCCCAGTCGTCGCCATCACG  
 GGGGAAGCACTTGTGGGTTTTTAAGCGACCTTGGCCGGATCATGAATGTGAGCGGGGGCCC  
 TATCACTAGAGAGGCCTCTAAAGAAATACCTGATTTCCCTTAAACATCTAGAACTGAAGACA  
 ACATTAAGGTGTGGTTTTAATAACAAAGGCTGGCATGCCCTGGTCAGCTTTCTCAATGTGGCC  
 CACAACGCCATCTTACGGGCCAGCCTGCCTAAGGACAGAAGCCCCGAGGAGTATGGAATCAC  
 CGTCATTAGCCAACCCCTGAACCTGACCAAGGAGCAGCTCTCAGAGATTACAGTGCTGACCA  
 CTTCAGTGGATGCTGTGGTTGCCATCTGCGTGATTTTCTCCATGTCTTTCGTCCCAGCCAGC  
 TTTGTCTTTATTTGATCCAGGAGCGGGTGAACAAATCCAAGCACCTCCAGTTTATCAGTGG  
 AGTGAGCCCCACCACCTACTGGGTAACCAACTTCCTCTGGGACATCATGAATTTATCCGTGA  
 GTGCTGGGCTGGTGGTGGGCATCTTCATCGGGTTTTCAGAAGAAAGCCTACACTTCTCCAGAA  
 AACCTTCTGCCCCTTGTGGCACTGCTCCTGCTGTATGGATGGGCGGTTCATTCATGATGTA  
 CCCAGCATCCTTCCCTGTTTTGATGTCCCCAGCACAGCCTATGTGGCTTTATCTTGTGCTAATC  
 TGTTTCATCGGCATCAACAGCAGTGCTATTACCTTCATCTTGGAAATATTTGAGAATAACCGG  
 ACGCTGCTCAGGTTCAACGCCGTGCTGAGGAAGCTGCTCATTGTCTTCCCCACTTCTGCCT  
 GGGCCGGGGCCTCATTGACCTTGCACTGAGCCAGGCTGTGACAGATGCTATGCCCGGTTTG  
 GTGAGGAGCACTCTGCAAAATCCGTTCCACTGGGACCTGATTGGGAAGAACCCTGTTTGCCATG  
 GTGGTGAAGGGGTGGTGTACTTCTCCTGACCCTGCTGGTCCAGCGCCACTTCTTCTCTC  
 CCAATGGATTGCCGAGCCCCTAAGGAGCCCATTGTTGATGAAGATGATGATGTGGCTGAAG  
 AAAGACAAAGAATTATTACTGGTGGAAATAAACTGACATCTTAAGGCTACATGAACCTAACCC  
 AAGATTTATCCAGGCACCTCCAGCCCAGCAGTGGACAGGCTGTGTGTGCGAGTTCCGCCCTGG  
 AGAGTGCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAATGGTGGCGGCAAAACAACCACATTCAGATGCTCA  
 CTGGGGACACCACAGTGACCTCAGGGGATGCCACCGTAGCAGGCAAGAGTATTTTAACCAAT  
 ATTTCTGAAGTCCATCAAAATATGGGCTACTGTCCTCAGTTTGTGCAATCGATGAGCTGCT  
 CACAGGACGAGAACATCTTTACCTTTATGCCCGGCTTCGAGGTGTACCAGCAGAAGAAATCG  
 AAAAGTTGCAAACTGGAGTATTAAGAGCCTGGGCTGACTGTCTACGCCGACTGCCTGGCT  
 GGCACGTACAGTGGGGGCAACAAGCGGAAACTCTCCACAGCCATCGCACTCATTGGCTGCC  
 ACCGCTGGTGTGCTGGATGAGCCCCACCACAGGGATGGACCCCCAGGCACGCCGCATGCTGT  
 GGAACGTTCATCGTGAGCATCATCAGAGAAGGGAGGGCTGTGGTCTCACATCCCACAGCATG  
 GAAGAATGTGAGGCACTGTGTACCCGGCTGGCCATCATGGTAAAGGGCGCCTTTTCGATGTAT  
 GGGCACCATTTCAGCATCTCAAGTCCAAATTTGGAGATGGCTATATCGTCACAATGAAGATCA  
 AATCCCCGAAGGACGACCTGCTTCTGACCTGAACCCTGTGGAGCAGTTCTTCCAGGGGAAC  
 TTCCCAGGCAGTGTGCAGAGGGAGAGGCACTACAACATGCTCCAGTTCCAGGTCTCTCCTC  
 CTCCCTGGCGAGGATCTTCCAGCTCCTCCTCTCCACAAGGACAGCCTGCTCATCGAGGAGT  
 ACTCAGTCACACAGACCACACTGGACCAGGTGTTTGTAAATTTTGTAAACAGCAGACTGAA  
 AGTCATGACCTCCCTCTGCACCCCTCGAGCTGCTGGAGCCAGTCGACAAGCCCAGGACGACTA  
 CAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGACAAGT  
 GAGCGGCCGC (SEQ ID No. 12)

**poliA de Sv40**

TTTCGAGCAGACATGATAAGATAACATTGATGAGTTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGA  
 AAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTG  
 CAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGGAGATGT  
 GGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGATAAGGATCTTCTC  
 AGAGCATGGCTAC (SEQ ID No. 13)

**ITR2 derecha**

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC  
 GGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC  
 GCGCAG (SEQ ID No. 10)

**ITR5 derecha**

TCACTGCTTACAAAACCCCCTTGCTTGAGAGTGTGGCACTCTCCCCCTGTCGCGTTCGCTC  
GCTCGCTGGCTCGTTTGGGGGGGCGACGGCCAGAGGGCCGTCTGCTGCGCAGCTCTTTGAGCT  
GCCACCCCCCAAACGAGCCAGCGAGCGAGCGAACCGCAGAGGGGGGAGAG (SEQ ID No.  
14)

**Secuencia de longitud completa de pZac2.1-ABCA4\_3'AK\_SV40**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG  
TCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGG  
GTTCTTGGATCCGGGATTTTGGCGATTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACA  
AAAAATTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTATAATTTTCAGGTGGCATTCTTTTCGAT  
AGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTCCATCCTGACGG  
GTCTGTGTCACCAACCTCTGGGACTGTGCTCGTTGGGGGAAGGGACATTGAAACCAGCCTG  
GATGCAGTCCGGCAGAGCCTTGGCATGTGTCCACAGCACAACATCCTGTTCCACCACCTCAC  
GGTGGCTGAGCACATGCTGTTCTATGCCAGCTGAAAGGAAAGTCCCAGGAGGAGGCCCAGC  
TGGAGATGGAAGCCATGTTGGAGGACACAGGCCTCCACCACAAGCGGAATGAAGAGGCTCAG  
GACCTATCAGGTGGCATGCLAGAGAAAAGCTGTGGTTGCCATTGCCCTTTGTGGGAGATGCCAA  
GGTGGTGATTTCTGGACGAACCCACCTCTGGGGTGGACCTTACTCGAGACGCTCAATCTGGG  
ATCTGCTCCTGAAGTATCGCTCAGGCAGAACCATCATCATGTCCACTCACCACATGGACGAG  
GCCGACCTCCTTGGGGACCGCATTGCCATCATTGCCAGGGAAAGGCTCTACTGCTCAGGCAC  
CCCCTCTTCTGAAGAACTGCTTTGGCACAGGCTTGTACTTAACCTTGGTGCGCAAGATGA  
AAAACATCCAGAGCCAAAGGAAAGGCAGTGAGGGGACCTGCAGCTGCTCGTCTAAGGGTTTC  
TCCACCACGTGTCCAGCCCACGTGATGACCTAACCAGAAAGTCCAGAAAGTCCAGGAGTGCATTG  
AAATGAGCTGATGGATGTAGTTCTCCACCATGTTCCAGAGGCAAAGCTGGTGGAGTGCATTG  
GTCAAGAACTTATCTTCTTCTTCCAAATAAGAACTTCAAGCACAGAGCATATGCCAGCCTT  
TTCAGAGAGCTGGAGGAGACGCTGGCTGACCTTGGTCTCAGCAGTTTGGAAATTTCTGACAC  
TCCCCGTGAAGAGATTTTCTGAAGGTACGGAGGATTCTGATTCAGGACCTCTGTTTTCGG  
GTGGCGCTCAGCAGAAAAGGAAAACGTCAACCCCGACACCCCTGCTTGGGTCCCAGGAGAG  
AAGGCTGGACAGACACCCAGGACTCCAATGTCTGCTCCCCAGGGGCGCCGGCTGCTCACC  
AGAGGGCCAGCCTCCCCAGAGCCAGAGTGCACAGGCCCGCAGCTCAACACGGGGACACAGC  
TGGTCCCTCCAGCATGTGCAGGCGCTGCTGGTCAAGAGATTCCAACACACCATCCGCAGCCAC  
AAGGACTTCTTGGCGCAGATCGTGCTCCCGGTACCTTTGTGTTTTTGGCTCTGATGCTTTC  
TATTGTTATCCCTCCTTTTGGCGAATACCCCGCTTTGACCCTTACCCCTGGATATATGGGC  
AGCAGTACACCTTCTTACGATGGATGAACCAGGCAGTGAGCAGTTCACGGTACTTGCAGAC  
GTCTCCTGAATAAGCCAGGCTTTGGCAACCGCTGCCTGAAGGAAGGGTGGCTTCCGGAGTA  
CCCCGTGGCAACTCAACACCCTGGAAGACTCCTTCTGTGTCCCCAAACATCACCAGCTGT  
TCCAGAAGCAGAAATGGACACAGGTCAACCCCTCACCATCCTGCAGGTGCAGCACCAGGGAG  
AAGCTCACCATGCTGCCAGAGTGCCCCGAGGGTGGCGGGGCTCCCGCCCCCAGAGAAC  
ACAGCGCAGCACGAAATTTCTACAAGACCTGACGGACAGGAACATCTCCGACTTCTTGGTAA  
AAACGTATCCTGCTCTTATAAGAAGCAGCTTAAAGAGCAAATTTCTGGGTCAATGAACAGAGG  
TATGGAGGAATTTCCATTGGAGGAAAGCTCCCAGTCTGCTCCCCATCACGGGGGAAGCACTTGT  
TGGGTTTTTAAGCGACCTTGGCCGGATCATGAATGTGAGCGGGGGCCCTATCACTAGAGAGG  
CCTCTAAAGAAATACCTGATTTCTTAAACATCTAGAACTGAAGACAACATTAAGGTGTGG  
TTTAATAACAAAGGCTGGCATGCCCTGGTCAGCTTCTCAATGTGGCCACAACGCCATCTT  
ACGGGCCAGCCTGCCTAAGGACAGAAGCCCCGAGGAGTATGGAATCACCGTCATTAGCCAAC

CCCTGAACCTGACCAAGGAGCAGCTCTCAGAGATTACAGTGCTGACCACTTCAGTGGATGCT  
 GTGGTTGCCATCTGCGTGATTTTCTCCATGTCCTTCGTCAGCCAGCTTTGTCCTTTATTT  
 GATCCAGGAGCGGGTGAACAAATCCAAGCACCTCCAGTTTATCAGTGGAGTGAGCCCCACCA  
 CCTACTGGGTAACCAACTTCCTCTGGGACATCATGAATTATTCCGTGAGTGCTGGGCTGGTG  
 GTGGGCATCTTCATCGGGTTTTCAGAAGAAAGCCTACACTTCTCCAGAAAACCTTCCTGCCCT  
 TGTGGCACTGCTCCTGCTGTATGGATGGGCGGTCATTCCCATGATGTACCCAGCATCCTTCC  
 TGTTTGATGTCCCCAGCACAGCCTATGTGGCCTTTATCTTGTGCTAATCTGTTTCATCGGCATC  
 AACAGCAGTGCTATTACCTTCATCTTGAATTATTTGAGAATAACCGGACGCTGCTCAGGTT  
 CAACGCCGTGCTGAGGAAGCTGCTCATTGTCTTCCCCACTTCTGCCTGGGCCGGGGCCTCA  
 TTGACCTTGCACTGAGCCAGGCTGTGACAGATGTCTATGCCCGGTTTGGTGAGGAGCACTCT  
 GCAAATCCGTTCCACTGGGACCTGATTGGGAAGAACCTGTTTGCCATGGTGGTGAAGGGGT  
 GGTGTAATCCTCCTGACCCTGCTGGTCCAGCGCCACTTCTTCTCTCCCAATGGATTGCCG  
 AGCCCACTAAGGAGCCCATTGTTGATGAAGATGATGATGTGGCTGAAGAAAGACAAAGAATT  
 ATTACTGGTGGAAATAAAACTGACATCTTAAGGCTACATGAACCTAACCAAGATTTATCCAGG  
 CACCTCCAGCCAGCAGTGGACAGGCTGTGTGTGCGGAGTTCGCCCTGGAGAGTGCTTTGGCC  
 TCCTGGGAGTGAATGGTGCCGGCAAAACAACCACATTCAAGATGCTCACTGGGGACACCACA  
 GTGACCTCAGGGGATGCCACCGTAGCAGGCAAGAGTATTTAACCAATATTTCTGAAGTCCA  
 TCAAAAATATGGGCTACTGTCTCAGTTTGATGCAATCGATGAGCTGCTCACAGGACGAGAAC  
 ATCTTTACCTTTATGCCCGGCTTCGAGGTGTACCAGCAGAAGAAATCGAAAAGGTTGCAAAAC  
 TGGAGTATTAAGAGCCTGGGCCTGACTGTCTACGCCGACTGCCTGGCTGGCACGTACAGTGG  
 GGGCAACAAGCGGAAACTCTCCACAGCCATCGCACTCATTGGCTGCCACCAGCTGGTGTGTC  
 TGGATGAGCCCACCACAGGGATGGACCCCCAGGCACGCCGATGCTGTGGAACGTCATCGTG  
 AGCATCATCAGAGAAGGGAGGGCTGTGGTCCACATCCCACAGCATGGAAGAATGTGAGGC  
 ACTGTGTACCCGGCTGGCCATCATGGTAAAGGGCGCCTTTTCGATGTATGGGCACCATTGAGC  
 ATCTCAAGTCCAAATTTGGAGATGGCTATATCGTCACAATGAAGATCAAATCCCCGAAGGAC  
 GACCTGCTTCTGACCTGAACCCTGTGGAGCAGTTCTTCCAGGGGAACTTCCCAGGCAGTGT  
 GCAGAGGGAGAGGCACTACAACATGCTCCAGTTCCAGGTCTCCTCCTCCTCCCTGGCGAGGA  
 TCTTCCAGCTCCTCCTCTCCACAAAGGACAGCCTGCTCATCGAGGAGTACTCAGTCACACAG  
 ACCACACTGGACCAGGTGTTTGTAAATTTTGCTAAACAGCAGACTGAAAGTCATGACCTCCC  
 TCTGCACCCTCGAGCTGCTGGAGCCAGTCGACAAGCCAGGACTGAGCGGCCGCTTCCGACA  
 GACATGATAAGATAACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATG  
 CTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAAC  
 AAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTTCAGGTTTCAGGGGGAGATGTGGGAGGTT  
 TTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTAAATCGATAAAGGATCTTCTTAGAGCATG  
 GCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAG  
 TTGGCCACTCCTCCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGGACCAAAGGTCGCCCG  
 ACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID No. 15)

**pZac2.1-CMV-ABCA4\_5'TS**

**Secuencia de longitud completa de pZac2.1-CMV-ABCA4\_5'TS**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG  
 TCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG  
 GTTCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAG  
 ATCTTCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGC  
 TATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCC  
 AATATGACCGCCATGTTGGCATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGT  
 CATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCT  
 GGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAAC

GCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGG  
 CAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGG  
 CCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTA  
 CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGAT  
 AGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTTGTTT  
 TGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTTCGTAATAACCCCGCCCGTTGACGCAAAAT  
 GGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTFCAGA  
 TCACTAGAAGCTTTATTGCGGTAGTTTTATCACAGTTAAATTTGCTAACGCAGTCAGTGCTTCT  
 GACACAACAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGAAGTTGGTTCGTGAGGCAGTGGGCAGGTAAGTAT  
 CAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAAAGTGGGCTTGTTCGAGACAGAGAAGAC  
 TCTTGGCTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCTTTCTCTCCACA  
 GGTGTCCACTCCAGTTCAATTACAGCTCTTAAGGCTAGAGTACTTAATACGACTCACTATA  
 GGCTAGCCTCGAGAATTCACGCGTGGTACCTCTAGAGTCGACCCGGGCGGCCCATGGGCT  
 TCGTGAGACAGATACAGCTTTTGTCTGGAAGAAGTGGACCCTGCGGAAAAGGCAAAAAGATT  
 CGTTTTGTGGTGGAACTCGTGTGGCCTTTATCTTTATTTCTGGTCTTGATCTGGTTAAGGAA  
 TGCCAACCCGCTCTACAGCCATCATGAATGCCATTTCCCAACAAGGCGATGCCCTCAGCAG  
 GAATGCTGCCGTGGCTCCAGGGGATCTTCTGCAATGTGAACAATCCCTGTTTTCAAAGCCCC  
 ACCCCAGGAGAATCTCCTGGAATTGTGTCAAACATAACAACCTCCATCTTGGCAAGGGTATA  
 TCGAGATTTTTCAAGAAGTCCCTCATGAATGCACCAGAGAGCCAGCACCTTGGCCGTATTTGGA  
 CAGAGCTACACATCTTGTCCCAATTCATGGACACCCTCCGGACTCACCCGGAGAGAATTGCA  
 GGAAGAGGAATTCGAATAAGGGATATCTTGAAAGATGAAGAAAACACTGACACTATTTCTCAT  
 TAAAAACATCGGCCTGTCTGACTCAGTGGTCTACCTTCTGATCAACTCTCAAGTCCGTCCAG  
 AGCAGTTTCGCTCATGGAGTCCCGGACCTGGCGCTGAAGGACATCGCCTGCAGCGAGGCCCTC  
 CTGGAGCGCTTCATCATCTTCAGCCAGAGACGCGGGGCAAAGACGGTGCCTATGCCCTGTG  
 CTCCTCTCCCAGGGCACCCCTACAGTGGATAGAAGACACTCTGTATGCCAACGTGGACTTCT  
 TCAAGCTCTCCGTGTGCTTCCCACACTCCTAGACAGCCGTTCTCAAGGTATCAATCTGAGA  
 TCTTGGGGAGGAATATTATCTGATATGTCACCAAGAATTCAAGAGTTTATCCATCGGCCGAG  
 TATGCAGGACTTGTGTGGGTGACCAGGCCCTCATGCAGAATGGTGGTCCAGAGACCTTTA  
 CAAAGCTGATGGGCATCCTGTCTGACCTCCTGTGTGGCTACCCCGAGGGAGGTGGCTCTCGG  
 GTGCTCTCCTTCAACTGGTATGAAGACAATAACTATAAGGCCCTTTCTGGGGATTGACTCCAC  
 AAGGAAGGATCCTATCTATTCTTATGACAGAAACACATCCTTTTGTAAATGCATTGATCC  
 AGAGCCTGGAGTCAAATCCTTTAACCAAAAATCGCTTGGAGGGCGGCAAAGCCTTTGCTGATG  
 GGAAAATCCTGTACACTCCTGATTACCTGCAGCACGAAGGATACTGAAGAATGCCAACTC  
 AACTTTTGAAGAAGTGAACACGTTAGGAAGTTGGTCAAAGCCTGGGAAGAAGTAGGGCCCC  
 AGATCTGGTACTTCTTTGACAACAGCACACAGATGAACATGATCAGAGATAACCCTGGGGAAC  
 CCAACAGTAAAAGACTTTTTGAATAGGCAGCTTGGTGAAGAAGGTATTAAGTCTGAAGCCAT  
 CCTAAACTTCTCTACAAGGGCCCTCGGGAAAAGCCAGGCTGACGACATGGCCAACCTTCGACT  
 GGAGGGACATATTTAACATCACTGATCGCACCCCTCCGCCTTGTCAATCAATACCTGGAGTGC  
 TTGGTCTGGATAAGTTTTGAAAGCTACAATGATGAAACTCAGCTCACCCAACGTGCCCTCTC  
 TCTACTGGAGGAAAACATGTTCTGGGCCGGAGTGGTATTCCCTGACATGTATCCCTGGACCA  
 GCTTCTTACCACCCACGTGAAGTATAAGATCCGAATGGACATAGACGTGGTGGAGAAAACC  
 AATAAGATTAAGACAGGTATTGGGATTCTGGTCCCAGAGCTGATCCCGTGGAAAGATTTCCG  
 GTACATCTGGGGCGGGTTTTGCCTATCTGCAGGACATGGTTGAACAGGGGATCACAAGGAGCC  
 AGGTGCAGGCGGAGGCTCCAGTTGGAATCTACCTCCAGCAGATGCCCTACCCCTGCTTCGTG  
 GACGATTCTTTCATGATCATCCTGAACCGCTGTTTCCCTATCTTCATGGTGTGGCATGGAT  
 CTACTCTGTCTCCATGACTGTGAAGAGCATCGTCTTGGAGAAGGAGTTGCGACTGAAGGAGA  
 CCTTGAAAAATCAGGGTGTCTCCAATGCAGTGATTTGGTGTACCTGGTTCCCTGGACAGCTTC  
 TCCATCATGTGATGAGCATCTTCCCTCCTGACGATATTCATCATGCATGGAAGAATCCTACA  
 TTACAGCGACCCATTCATCTTCTTCTGTTCTTGTGGCTTTCTCCACTGCCACCATCATGC  
 TGTGCTTTCTGCTCAGCACCTTCTTCTCCAAGGCCAGTCTGGCAGCAGCCTGTAGTGGTGTG  
 ATCTATTTACCCCTCTACCTGCCACACATCCTGTGCTTCGCCTGGCAGGACCCGCATGACCCG



TGAGCTGAAGAAGGCTGTGAGCTTACTGTCTCCGGTGGCATTGGATTGGCACTGAGTACC  
TGGTTCGCTTTGAAGAGCAAGGCCTGGGGCTGCAGTGGAGCAACATCGGGAACAGTCCCACG  
GAAGGGGACGAATTCAGCTTCTGCTGTCCATGCAGATGATGCTCCTTGATGCTGCTGTCTA  
TGGCTTACTCGCTTGGTACCTTGATCAGGTGTTTCCAGGAGACTATGGAACCCCACTTCCTT  
GGTACTTTCTTCTACAAGAGTCGTATTGGCTTGGCGGTGAAGGGTGTCAACCAGAGAAGAA  
AGAGCCCTGGAAAAGACCGAGCCCTAACAGAGGAAACGGAGGATCCAGAGCACCCAGAAGG  
AATACACGACTCCTTCTTTGAACGTGAGCATCCAGGGTGGGTTCTGGGGTATGCGTGAAGA  
ATCTGGTAAAGATTTTTGAGCCCTGTGGCCGGCCAGCTGTGGACCGTCTGAACATCACCTTC  
TACGAGAACCAGATCACCGCATTCTGGGCCACAATGGAGCTGGGAAAACCACCACCTTGTA  
AGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGACAGAG  
AAGACTCTTGCCTTCTCAATTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGC  
GCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCAGCCTGGGCTTTGCCCGG  
GCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID No. 16)

**pZac2.1-ABCA4\_3'TS\_SV40**

**Secuencia de longitud completa de pZac2.1-ABCA4\_3'TS\_SV40**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG  
TCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGG  
GTTCTTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTCCA  
TCCTGACGGGTCTGTTGCCACCAACCTCTGGGACTGTGCTCGTTGGGGGAAGGGACATTGAA  
ACCAGCCTGGATGCAGTCCGGCAGAGCCTTGGCATGTGTCCACAGCACAAACATCCTGTTCCA  
CCACCTCACGGTGGCTGAGCACATGCTGTTCTATGCCAGCTGAAAGGAAAGTCCCAGGAGG  
AGGCCCAGCTGGAGATGGAAGCCATGTTGGAGGACACAGGCCTCCACCACAAGCGGAATGAA  
GAGGCTCAGGACCTATCAGGTGGCATGCAGAGAAAGCTGTGCGTTGCCATTGCCTTTGTGGG  
AGATGCCAAGGTGGTATTCTGGACGAACCCACCTCTGGGGTGGACCTTACTCGAGACGCT  
CAATCTGGGATCTGCTCCTGAAGTATCGCTCAGGCAGAACCATCATCATGTCCACTCACCCAC  
ATGGACGAGGCCGACCTCCTTGGGGACCGCATTGCCATCATTGCCAGGGAAGGCTCTACTG  
CTCAGGCACCCCACTCTTCTGAAGAACTGCTTTGGCACAGGCTTGTACTTAACCTTGGTGC  
GCAAGATGAAAACATCCAGAGCCAAAGGAAAGGAGTGGGGGACCTGCAGCTGCTCGTCT  
AAGGGTTTCTCCACCAGTGTCCAGCCACGTCGATGACCTAACTCCAGAACAAGCTTGGAT  
TGGGGATGTAAATGAGCTGATGGATGTAGTTCTCCACCATGTTCCAGAGGCAAAGCTGGTGG  
AGTGCATTGGTCAAGAACTTATCTTCTTCCAAATAAGAAGTCAAGCACAGAGCATAT  
GCCAGCCTTTTCAGAGAGCTGGAGGAGACGCTGGCTGACCTTGGTCTCAGCAGTTTTGGAAT  
TTCTGACACTCCCCTGGAAGAGATTTTTCTGAAGGTCACGGAGGATTCTGATTCCAGGACCTC  
TGTTTTCGGGTTGGCGCTCAGCAGAAAAGAGAAAACGTCACCCCCGACACCCCTGCTTGGGT  
CCCAGAGAGAAGGCTGGACAGACACCCAGGACTCCAATGTCTGCTCCCCAGGGGCGCCGGC  
TGCTCACCCAGAGGGCCAGCCTCCCCAGAGCCAGAGTGCCAGGCCCGCAGCTCAACACGG  
GGACACAGCTGGTCTCCAGCATGTGCAGGCGCTGCTGGTCAAGAGATTCCAACACACCATC  
CGCAGCCACAAGGACTTCTGGCGCAGATCGTGTCTCCCGGCTACCTTTGTGTTTTTGGCTCT  
GATGCTTTCTATTGTTATCCCTCCTTTTGGCGAATACCCCGCTTTGACCTTCACCCCTGGA  
TATATGGGCAGCAGTACACCTTCTTACGCATGGATGAACCAGGCAGTGAAGCAGTTACCGGTA  
CTTGCAGACGTCCTCCTGAATAAGCCAGGCTTTGGCAACCGCTGCCTGAAGGAAGGGTGGCT  
TCCGGAGTACCCCTGTGGCAACTCAACACCCGGAAGACTCCTTCTGTGTCCCCAAACATCA  
CCCAGCTGTTCCAGAAGCAGAAATGGACACAGGTCAACCCTTACCATCCTGCAGGTGCAGC  
ACCAGGGAGAAGCTCACCATGCTGCCAGAGTGCCCCGAGGGTGCCGGGGGCTCCCGCCCC  
CCAGAGAACACAGCGCAGCACGGAATTTCTACAAGACCTGACGGACAGGAACATCTCCGACT  
TCTTGGTAAAAACGTATCCTGCTCTTATAAGAAGCAGCTTAAAGAGCAAATTTCTGGGTCAAT

GAACAGAGGTATGGAGGAATTTCCATTGGAGGAAAGCTCCCAGTCGTCCCCATCACGGGGGA  
 AGCACTTGTGGGTTTTTAAGCGACCTGGCCGGATCATGAATGTGAGCGGGGGCCCTATCA  
 CTAGAGAGGCCTCTAAAGAAATACCTGATTTCCCTTAAACATCTAGAACTGAAGACAACATT  
 AAGGTGTGGTTTTAATAACAAAGGCTGGCATGCCCTGGTCAGCTTTCTCAATGTGGCCACAA  
 CGCCATCTTACGGGCCAGCCTGCCTAAGGACAGAAGCCCCGAGGAGTATGGAATCACCGTCA  
 TTAGCCAACCCCTGAACCTGACCAAGGAGCAGCTCTCAGAGATTACAGTGCTGACCACTTCA  
 GTGGATGCTGTGGTTGCCATCTGCGTGATTTTCTCCATGTCCTTCGTCCCAGCCAGCTTTGT  
 CCTTTATTTGATCCAGGAGCGGGTGAACAAAATCCAAGCACCTCCAGTTTATCAGTGGAGTGA  
 GCCCCACCACCTACTGGGTAACCAACTTCCTCTGGGACATCATGAATTATCCGTGAGTGCT  
 GGGCTGGTGGTGGGCATCTTCATCGGGTTTCAGAAGAAAGCCTACACTTCTCCAGAAAACCT  
 TCCTGCCCTTGTGGCACTGCTCCTGCTGTATGGATGGGCGGTCAATCCCATGATGTACCCAG  
 CATCCTTCCTGTTTGTATGTCCCCAGCACAGCCTATGTGGCTTTATCTTGTGCTAATCTGTTT  
 ATCGGCATCAACAGCAGTGCTATTACCTTCATCTTGAATTTATTTGAGAATAACCGGACGCT  
 GCTCAGGTTCAACGCCGTGCTGAGGAAGCTGCTCATTGTCTTCCCCACTTCTGCCTGGGCC  
 GGGGCTCATTTGACCTTGCCTGAGCCAGGCTGTGACAGATGTCTATGCCCGGTTTGGTGAG  
 GAGCACTCTGCAAATCCGTTCCACTGGGACCTGATTGGGAAGAACCTGTTTGCCATGGTGGT  
 GGAAGGGGTGGTGTACTTCCTCCTGACCCCTGCTGGTCCAGCGCCACTTCTTCCTCTCCCAAT  
 GGATTGCCGAGCCACTAAGGAGCCATTGTTGATGAAGATGATGATGTGGCTGAAGAAAGA  
 CAAAGAATTATTACTGGTGGAAATAAACTGACATCTTAAGGCTACATGAACTAACCAAGAT  
 TTATCCAGGCACCTCCAGCCCAGCAGTGGACAGGCTGTGTGTTCGGAGTTCGCCCTGGAGAGT  
 GCTTTGGCCTCCTGGGAGTGAATGGTGCCGGCAAAACAACCACATTC AAGATGCTCACTGGG  
 GACACCACAGTGACCTCAGGGGATGCCACCGTAGCAGGCAAGAGTATTTTAACCAATATTTT  
 TGAAGTCCATCAAAATATGGGCTACTGTCCCTCAGTTTGTATGCAATCGATGAGCTGCTCACAG  
 GACGAGAACATCTTTACCTTTATGCCCGGCTTCGAGGTGTACCAGCAGAAGAAATCGAAAAG  
 GTTGCAAACTGGAGTATTAAGAGCCTGGGCCGTACTGTCTACGCCGACTGCCCTGGCTGGCAC  
 GTACAGTGGGGGCAACAAGCGGAAACTCTCCACAGCCATCGCACTCATTTGGCTGCCACCCGC  
 TGGTGTCTGGATGAGCCCACCACAGGGATGGACCCCCAGGCACGCCGCATGCTGTGGAAC  
 GTCATCGTGAGCATCATCAGAGAAGGGAGGGCTGTGGTCCCTCACATCCACAGCATGGAAGA  
 ATGTGAGGCACTGTGTACCCGGCTGGCCATCATGGTAAAGGGCGCCTTTCGATGTATGGGCA  
 CCATTCAGCATCTCAAGTCCAAATTTGGAGATGGCTATATCGTCACAATGAAGATCAAATCC  
 CCGAAGGACGACCTGCTTCCTGACCTGAACCTGTGGAGCAGTTCTTCCAGGGGAACTTCCC  
 AGGCAGTGTGCAGAGGGAGAGGCACTACAACATGCTCCAGTTCAGGTCTCCTCCTCCTCCC  
 TGGCGAGGATCTTCCAGCTCCTCCTCTCCACAAGGACAGCCTGCTCATCGAGGAGTACTCA  
 GTCACACAGACCACACTGGACCAGGTGTTTGTAATTTTGCTAAACAGCAGACTGAAAGTCA  
 TGACCTCCCTCTGCACCCCTCGAGCTGCTGGAGCCAGTCGACAAGCCCAGGACTGAGCGGCCG  
 CTTTCGAGCAGATGATAAAGATACATTTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTG  
 AAAAAATGCTTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCT  
 GCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTCATTCTTTTATGTTTCAGTTTCAGGGGGAGATG  
 TGGGAGGTTTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCGATAAGGATCTTCC  
 TAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACCTACAAGGAACCCCTA  
 GTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAA  
 GGTGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ  
 ID No. 17)

**MYO7A**

**pAAV2.1-CBA-MYO7A\_5'AK**

**5' ITR2**

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC  
 GGGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC  
 5 GCGCAG (SEQ ID No. 10)

**ITR5 izquierda**

CTCTCCCCCTGTGCGTTCGCTCGCTCGCTGGCTCGTTTTGGGGGGTGGCAGCTCAAAGAG  
 CTGCCAGACGACGGCCCTCTGGCCGTGCCCGCCCAACGAGCCAGCGAGCGAGCGAACCGG  
 ACAGGGGGGAGAGTGCCACACTCTCAAGCAAGGGGTTTTGTAAAGCAGTGA (SEQ ID No.  
 18)

**Potenciador de CMV**

GCTAGCGTGCCACCTGGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGG  
GTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCG  
CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA  
ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTT  
GGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT  
GGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATC  
TACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGG (SEQ ID No. 19)

**Promotor de CBA**

TCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCCCAATT  
TTGTATTTATTTATTTTTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCG  
CGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCA  
GCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGCGGCC  
CTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGGCGG (SEQ ID No. 20)

**5 Intrón de SV40**

GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGACA  
GAGAAGACTCTTGCCTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTC  
TCTCCACAG (SEQ ID No. 21)

**CDS de 5'hMYO7A**

ATGGTGATTCTTTCAGCAGGGGGACCATGTGTGGATGGACCTGAGATTGGGGCAGGAGTTCGA  
CGTGCCCATCGGGGCGGTGGTGAAGCTCTGCGACTCTGGGCAGGTCCAGGTGGTGGATGATG  
AAGACAATGAACACTGGATCTCTCCGCAGAACGCAACGCACATCAAGCCTATGCACCCCACG  
TCGGTCCACGGCGTGGAGGACATGATCCGCCGTTGGGGACCTCAACGAGGCGGGCATCTTGCG  
CAACCTGCTTATCCGCTACCGGGACCACCTCATCTACACGTATACGGGCTCCATCCTGGTGG  
CTGTGAACCCCTACCAGCTGCTCTCCATCTACTCGCCAGAGCACATCCGCCAGTATACCAAC  
AAGAAGATTGGGGAGATGCCCCCCCACATCTTTGCCATTGCTGACAACTGCTACTTCAACAT  
GAAACGCAACAGCCGAGACCAGTGTGTCATCATCAGTGGGGAATCTGGGGCCGGGAAGACGG  
AGAGCACAAAGCTGATCCTGCAGTTCTTGGCAGCCATCAGTGGGCAGCACTCGTGGATTGAG  
CAGCAGGTCTTGGAGGCCACCCCCATTTCTGGAAGCATTTGGGAATGCCAAGACCATCCGCAA  
TGACAACTCAAGCCGTTTTCGAAAGTACATCGACATCCACTTCAACAAGCGGGGCGCCATCG  
AGGGCGGAAGATTGAGCAGTACCTGCTGGAAAAGTACAGTGTCTGTGCGCCAGGCCCTGGAT  
GAAAGGAAC TACCACGTGTTCTACTGCATGCTGGAGGGCATGAGTGAGGATCAGAAGAAGAA  
GCTGGGCTTGGGCCAGGCCTCTGACTACAAC TACTTGGCCATGGGTAAC TGCATAACCTGTG  
AGGGCCGGGTGGACAGCCAGGAGTACGCCAACATCCGCTCCGCCATGAAGGTGCTCATGTTT  
ACTGACACCGAGA ACTGGGAGATCTCGAAGCTCCTGGCTGCCATCCTGCACCTGGGCAACCT  
GCAGTATGAGGCACGCACATTTGAAAACCTGGATGCCTGTGAGGTTCTTCTCCCCATCGC

TGGCCACAGCTGCATCCCTGCTTGAGGTGAACCCCCAGACCTGATGAGCTGCCTGACTAGC  
 CGCACCTCATCACCCGCGGGGAGACGGTGTCCACCCCACTGAGCAGGGAACAGGCCTGGA  
 CGTGC GCGACGCCTTCGTAAAGGGGATCTACGGGCGGCTGTTTCGTGTGGATTGTGGACAAGA  
 TCAACGCAGCAATTTACAAGCCTCCCTCCCAGGATGTGAAGA ACTCTCGCAGGTCCATCGGC  
 CTCTGGACATCTTTGGGTTTTGAGAACTTTGCTGTGAACAGCTTTGAGCAGCTCTGCATCAA  
 CTTTCGCAATGAGCACCTGCAGCAGTCTTTGTGCGGCACGTGTTCAAGCTGGAGCAGGAGG  
 AATATGACCTGGAGAGCATTGACTGGCTGCACATCGAGTTCACTGACAACCAGGATGCCCTG  
 GACATGATTGCCAACAAGCCCATGAACATCATCTCCCTCATCGATGAGGAGAGCAAGTTCCC  
 CAAGGGCACAGACACCACCATGTTACACAAGCTGAACTCCCAGCACAAGCTCAACGCCAACT  
 ACATCCCCCCCCAAGAACAACCATGAGACCCAGTTTGGCATCAACCATTTTGCAGGCATCGTC  
 TACTATGAGACCCAAGGCTTCCCTGGAGAAGAACCAGACACCCTGCATGGGGACATTATCCA  
 GCTGGTCCACTCCTCCAGGAACAAGTTCATCAAGCAGATCTTCCAGGCCGATGTGCCATGG  
 GCGCCGAGACCAGGAAGCGCTCGCCACACTTAGCAGCCAGTTCAAGCGGTCACTGGAGCTG  
 CTGATGCGCACGCTGGGTGCCTGCCAGCCCTTCTTTGTGCGATGCATCAAGCCCAATGAGTT  
 CAAGAAGCCCATGCTGTTTCGACCCGGCACCTGTGCGTGCGCCAGCTGCGGTACTCAGGAATGA  
 TGGAGACCATCCGAATCCGCCGAGCTGGCTACCCCATCCGCTACAGCTTCGTAGAGTTTGTG  
 GAGCGGTACCCTGTGCTGCTGCCAGGTGTGAAGCCGGCCTACAAGCAGGGCGACCTCCGCGG  
 GACTTGCCAGCGCATGGCTGAGGCTGTGCTGGGCACCCACGATGACTGGCAGATAGGCAAAA  
 CCAAGATCTTTCTGAAGGACCACCATGACATGCTGCTGGAAGTGGAGCGGGACAAAGCCATC  
 ACCGACAGAGTCATCCTCCTTCAGAAAAGTCATCCGGGGATTCAAAGACAGGTCTAACTTTCT  
 GAAGCTGAAGAACGCTGCCACACTGATCCAGAGGCACTGGCGGGGTCACAACTGTAGGAAGA  
 ACTACGGGCTGATGCGTCTGGGCTTCTGCGGCTGCAGGCCCTGCACCGCTCCCGGAAGCTG  
 CACCAGCAGTACCGCCTGGCCCGCCAGCGCATCATCCAGTTCCAGGCCCGCTGCCGCGCCTA  
 TCTGGTGC GCAAGGCCTTCCGCCACCGCTCTGGGCTGTGCTCACCGTGCAGGCCATGCCC  
 GGGGCATGATCGCCCGCAGGCTGCACCAACGCCTCAGGGCTGAGTATCTGTGGCGCCTCGAG  
 GCTGAGAAAAATGCGGCTGGCGGAGGAAGAGAAGCTTCGGAAGGAGATGAGCGCCAAGAAGGC  
 CAAGGAGGAGGCCGAGCGCAAGCATCAGGAGCGCCTGGCCAGCTGGCTCGTGAGGACGCTG  
 AGCGGGAGCTGAAGGAGAAGGAGGCCGCTCGGCGGAAGAAGGAGCTCCTGGAGCAGATGGAA  
 AGGGCCCGCCATGAGCCTGTCAATCACTCAGACATGGTGGACAAGATGTTTGGCTTCCCTGGG  
 GACTTCAGGTGGCCTGCCAGGCCAGGAGGGCCAGGCACCTAGTGGCTTTGAGGACCTGGAGC  
 GAGGGCGGAGGGAGATGGTGGAGGAGGACCTGGATGCAGCCCTGCCCTGCCTGACGAGGAT  
 GAGGAGGACCTCTCTGAGTATAAAATTTGCCAAGTTTCGCGGCCACCTACTTCCAGGGGACAAC  
 TACGCACTCCTACACCCGGCGGCCACTCAAACAGCCACTGCTCTACCATGACGACGAGGGTG  
 ACCAGCTG (SEQ ID No. 22)

**Señal donante de ruptura**

GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGACA  
 GAGAAGACTCTTGCCTTTCT (SEQ ID No. 1)

**AK**

5 GGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC  
 GAATTTTAACAAAAT (SEQ ID No. 3)

**3'ITR2**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCGGCGACCTTTGG  
 TCGCCCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGG  
 GTTCCCT (SEQ ID No. 4)

**Secuencia completa de pAAV2.1-CBA-MYO7A\_5'AK**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTTCGGGCGACCTTTGG  
 TCGCCCGGCCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG  
 GTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAG  
 ATCCTAATCGGGAATTCGCCCTTAAGCTAGCGTGCCACCTGGTCGACATTGATTATTGACTA  
 GTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTT  
 ACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTC  
 AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG  
 ACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCC  
 CCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG  
 GGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGCGAGGTG  
 AGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTTGTATTT  
 ATTTATTTTTTAATTATTTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCAGGC  
 GGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCA  
 GAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTTCTTTTTATGGCGAGGCGGGCGGGCGGGCCCTATAAAA  
 AGCGAAGCGCGGGCGGGCGGCTGCAGAAGTTGGTTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCA  
 AGGTTACAAGACAGGTTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTC  
 TTGCGTTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGG  
 TGTCCAGGCGGGCCCGCCATGGTGATTCTTCAGCAGGGGGACCATGTGTGGATGGACCTGAGAT  
 TGGGGCAGGAGTTGCGAGCTGCCCATCGGGGCGGTGGTGAAGCTCTGCGACTCTGGGCAGGTC  
 CAGGTGGTGGATGATGAAGACAATGAACACTGGATCTCTCCGCAGAACGCAACGCACATCAA  
 GCCTATGCACCCACGTCGGTCCACGGCGTGGAGGACATGATCCGCCTGGGGGACCTCAACG  
 AGGCGGGCATCTTGCGCAACCTGCTTATCCGCTACCGGGACCACCTCATCTACACGTATACG  
 GGCTCCATCCTGGTGGCTGTGAACCCCTACCAGCTGCTCTCCATCTACTCGCCAGAGCACAT  
 CCGCCAGTATAACCAACAAGAAGATTGGGGAGATGCCCCCCCACATCTTTGCCATTGCTGACA  
 ACTGTACTTCAACATGAAACGCAACAGCCGAGACCAGTGTGTCATCATCAGTGGGGAATCT  
 GGGGCCGGGAAGACGGAGAGCAAAAGCTGATCCTGCAGTTCTTGGCAGCCATCAGTGGGCA  
 GCACTCGTGGATTGAGCAGCAGGTCTTGGAGGCCACCCCATCTGGAAGCATTTGGGAATG  
 CCAAGACCATCCGCAATGACAACCTCAAGCCGTTTTCGAAAGTACATCGACATCCACTTCAAC  
 AAGCGGGGCGCCATCGAGGGCGGAAGATTGAGCAGTACCTGCTGGAAAAGTACAGTGTCTG  
 TCGCCAGGCCCTGCATGAAAGGAACTACCACGTGTTCTACTGCATGCTGGAGGGCATGAGTG  
 AGGATCAGAAAGAAAGTGGGCTTGGGCCAGGCCTCTGACTACAACTACTTGGCCATGGGT  
 AACTGCATAACCTGTGAGGGCCGGGTGGACAGCCAGGAGTACGCCAACATCCGCTCCGCCAT  
 GAAGGTGCTCATGTTCACTGACACCGAGAACTGGGAGATCTCGAAGCTCCTGGCTGCCATCC  
 TGCACCTGGGCAACCTGCAGTATGAGGCACGCACATTTGAAAACCTGGATGCCTGTGAGGTT  
 CTCTTCTCCCCATCGCTGGCCACAGCTGCATCCCTGCTTGGAGTGAACCCCCCAGACCTGAT  
 GAGCTGCCTGACTAGCCGCACCCCTCATCACCCGCGGGGAGACGGTGTCCACCCCACTGAGCA  
 GGGAACAGGCACTGGACGTGCGCGACGCCTTCGTAAGGGGATCTACGGGCGGCTGTTCTGTG  
 TGGATTGTGGACAAGATCAACGCAGCAATTTACAAGCCTCCCTCCCAGGATGTGAAGAACTC  
 TCGCAGGTCCATCGGCCTCCTGGACATCTTTGGGTTTGGAGAACTTTGCTGTGAACAGCTTTG  
 AGCAGCTCTGCATCAACTTCGCCAATGAGCACCTGCAGCAGTTCTTTGTGCGGCACGTGTTT  
 AAGCTGGAGCAGGAGGAATATGACCTGGAGAGCATTGACTGGCTGCACATCGAGTTCACATGA  
 CAACCAGGATGCCCTGGACATGATTGCCAACAAGCCCATGAACATCATCTCCCTCATCGATG  
 AGGAGAGCAAGTTCCCCAAGGGCACAGACACCACCATGTTACACAAGCTGAACTCCCAGCAC  
 AAGCTCAACGCCAACTACATCCCCCAAGAACAACCATGAGACCCAGTTTGGCATCAACCA  
 TTTTGCAGGCATCGTCTACTATGAGACCCAAGGCTTCTGGAGAAGAACCAGACACCCTGC  
 ATGGGGACATTATCCAGCTGGTCCACTCCTCCAGGAACAAGTTCATCAAGCAGATCTTCCAG  
 GCCGATGTGCGCCATGGGCGCCGAGACCAGGAAGCGCTCGCCACACTTAGCAGCCAGTTCAA  
 GCGGTCACTGGAGCTGCTGATGCGCACGCTGGGTGCCTGCCAGCCCTTCTTTGTGCGATGCA  
 TCAAGCCCAATGAGTTCAAGAAGCCCATGCTGTTTCGACCGGCACCTGTGCGTGCGCCAGCTG  
 CGGTACTCAGGAATGATGGAGACCATCCGAATCCGCCGAGCTGGCTACCCCATCCGCTACAG  
 CTTTCGTAGAGTTTGTGGAGCGGTACCGTGTGCTGCTGCCAGGTGTGAAGCCGGCCTACAAGC

AGGGCGACCTCCGCGGGACTTGCCAGCGCATGGCTGAGGCTGTGCTGGGCACCCACGATGAC  
TGGCAGATAGGCCAAAACCAAGATCTTTCTGAAGGACCACCATGACATGCTGCTGGAAGTGA  
GCGGGACAAAGCCATCACCGACAGAGTCATCCTCCTCAGAAAAGTCATCCGGGGATTCAAAG  
ACAGGTCTAACTTTCTGAAGCTGAAGAACGCTGCCACACTGATCCAGAGGCACTGGCGGGGT  
CACAACTGTAGGAAGAATAACGGCTGATGCGTCTGGGCTTCTGCGGCTGCAGGCCCTGCA  
CCGCTCCCGGAAGCTGCACCAGCAGTACCGCCTGGCCCCGCCAGCGCATCATCCAGTTCCAGG  
CCCGCTGCCGCGCCTATCTGGTGCACAAGGCCCTCCGCCACCGCCTCTGGGCTGTGCTCACC  
GTGCAGGCCATGCCCCGGGGCATGATCGCCCGCAGGCTGCACCAACGCCTCAGGGCTGAGTA  
TCTGTGGCGCCTCGAGGCTGAGAAAATGCGGCTGGCGGAGGAAGAGAAGCTTCGGAAGGAGA  
TGAGCGCCAAGAAGGCCAAGGAGGAGGCCGAGCGCAAGCATCAGGAGCGCCTGGCCCAGCTG  
GCTCGTGAGGACGCTGAGCGGGAGCTGAAGGAGAAGGAGGCCGCTCGGCGGAAGAAGGAGCT  
CCTGGAGCAGATGGAAAGGGCCCCGCATGAGCCTGTCAATCACTCAGACATGGTGGACAAGA  
TGTTTGGCTTCTGGGGACTTCAGGTGGCCTGCCAGGCCAGGAGGGCCAGGCACCTAGTGGC  
TTTGAGGACCTGGAGCGAGGGCGGAGGAGATGGTGGAGGAGGACCTGGATGCAGCCCTGCC  
CCTGCCCTGACGAGGATGAGGAGGACCTCTCTGAGTATAAATTTGCCAAGTTCGCGGCCACCT  
ACTTCCAGGGGACAACACTACGCACTCCTACACCCGGCGGCCACTCAAACAGCCACTGCTCTAC  
CATGACGACGAGGGTACCAGCTGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGTTTTAAGGAGACCA  
ATAGAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCCTTTCTGGGATTTTGCCGATTTTCG  
GCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAAATTT  
AACGTTTATAATTTAGGTGGCATCTTTCCAATTGAAGGGCGAATTTCCGATCTTCTTAGAGC  
ATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACATAAGGAACCCCTAGTGATG  
GAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCG  
CCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID No.  
23)

**pAAV2.1-MYO7A\_3'AK\_BGH**

**5' ITR2**

AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC  
GGGCGACCAAAGGTCGCCCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGC  
GCGCAG (SEQ ID No. 10)

**5 AK**

GGGATTTTGCCGATTTCCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC  
GAATTTTAACAAAAT (SEQ ID No. 3)

**Señal aceptora de ruptura**

GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG (SEQ ID No. 1)

**3'hMYO7A CDS**

GCAGCCCTGGCGGTCTGGATCACCATCCTCCGCTTCATGGGGGACCTCCCTGAGCCCAAGTA  
CCACACAGCCATGAGTGATGGCAGTGAGAAGATCCCTGTGATGACCAAGATTTATGAGACCC  
TGGGCAAGAAGACGTACAAGAGGGAGCTGCAGGCCCTGCAGGGCGAGGGCGAGGCCAGCTC  
CCCGAGGGCCAGAAGAAGAGCAGTGTGAGGCACAAGCTGGTGCATTTGACTCTGAAAAAGAA  
GTCCAAGCTCACAGAGGAGGTGACCAAGAGGCTGCATGACGGGGAGTCCACAGTGCAGGGCA  
ACAGCATGCTGGAGGACCGGCCACCTCCAACCTGGAGAAGCTGCACTTCATCATCGGCAAT  
GGCATCCTGCGGCCAGCACTCCGGGACGAGATCTACTGCCAGATCAGCAAGCAGCTGACCCA  
CAACCCCTCCAAGAGCAGCTATGCCCGGGCTGGATTCTCGTGTCTCTCTGCGTGGGCTGTT  
TCGCCCCCTCCGAGAAGTTGTCAAGTACCTGCGGAACCTTCATCCACGGGGGCCCGCCCGGC

10

TACGCCCGTACTGTGAGGAGCGCCTGAGAAGGACCTTTGTCAATGGGACACGGACACAGCC  
 GCCCAGCTGGCTGGAGCTGCAGGCCACCAAGTCCAAGAAGCCAATCATGTTGCCCGTGACAT  
 TCATGGATGGGACCACCAAGACCCTGCTGACGGACTCGGCAACCACGGCCAAGGAGCTCTGC  
 AACGCGCTGGCCGACAAGATCTCTCTCAAGGACCGGTTCCGGTTCTCCCTCTACATTGCCCT  
 GTTTGACAAGGTGTCTCCCTGGGCAGCGGCAGTGACCACGTCATGGACGCCATCTCCAGT  
 GCGAGCAGTACGCCAAGGAGCAGGGCGCCAGGAGCGCAACGCCCCCTGGAGGCTCTTCTTC  
 CGCAAAGAGGTCTTCACGCCCTGGCACAGCCCCCTCCGAGGACAACGTGGCCACCAACCTCAT  
 CTACCAGCAGGTGGTGGCAGGAGTCAAGTTTTGGGGAGTACAGGTGTGAGAAGGAGGACGACC  
 TGGCTGAGCTGGCCTCCCAGCAGTACTTTGTAGACTATGGCTCTGAGATGATCCTGGAGCGC  
 CTCTGAACCTCGTGCCACCTACATCCCCGACCGGAGATCACGCCCTGAAGACGCTGGA  
 GAAGTGGGCCAGCTGGCCATCGCCGCCACAAGAAGGGGATTTATGCCCAGAGGAGAACTG  
 ATGCCCAGAAGGTCAAAGAGGATGTGGTCAAGTTATGCCCGCTTCAAGTGGCCCTTGCTCTTC  
 TCCAGGTTTTATGAAGCCTACAAATTTCTCAGGCCCCAGTCTCCCCAAGAACGACGTCATCGT  
 GGCCGTCAACTGGACGGGTGTGTACTTTGTGGATGAGCAGGAGCAGGTAATCTGGAGCTGT  
 CCTTCCAGAGATCATGGCCGTGTCCAGCAGCAGGGAGTGCCGTGTCTGGCTCTCACTGGGC  
 TGCTCTGATCTTGGCTGTGCTGCGCCTCACTCAGGCTGGGCAGGACTGACCCCGGGGGGCC  
 CTGTTCTCCGTGTTGGTCTGCAGGGGAGCGAAAACGACGGCCCCAGCTTCACGCTGGCCA  
 CCATCAAGGGGGACGAATACACCTTCACCTCCAGTAATGCTGAGGACATTCGTGACCTGGTG  
 GTCACCTTCTAGAGGGGCTCCGGAAGAGATCTAAGTATGTTGTGGCCCTGCAGGATAACCC  
 CAACCCCGCAGGCGAGGAGTCAAGGCTTCTCAGCTTTGCCAAGGGAGACCTCATCCTGAG  
 ACCATGACACGGGCGAGCAGGTCATGAACCTCGGGCTGGGCCAACGGCATCAATGAGAGGACC  
 AAGCAGCTGGGGACTTCCCCACCGACTGTGTGTACGTATGCCACTGTCAACCATGCCACC  
 TCGTGAGATTGTGGCCCTGGTCAACATGACTCCCGATCAGAGGCAGGACGTTGTCCGGCTCT  
 TGCAGCTGCCAACGGCGGAGCCCCGAGGTGCGTGCCAAGCCCTACACGCTGGAGGAGTTTTCC  
 TATGACTACTTCCAGGCCCCACCCAAGCACACGCTGAGCCGTGTCATGGTGTCCAAGGCCCG  
 AGGCAAGGACCGGCTGTGGAGCCACACGCGGGAACCGCTCAAGCAGGCGCTGCTCAAGAAGC  
 TCCTGGGCAGTGAGGAGCTCTCGCAGGAGGCCCTGCCTGGCCTTCAATTGCTGTGCTCAAGTAC  
 ATGGGCGACTACCCGTCCAAGAGGACACGCTCCGTCAATGAGCTCACCGACCAGATCTTTGA  
 GGGTCCCCTGAAAGCCGAGCCCCGTAAGGACGAGGCATATGTGCAGATCCTGAAGCAGCTGA  
 CCCACAACCACATCAGGTACAGCGAGGAGCGGGCTTGGCAGCTGCTCTGGCTGTGCACGGCC  
 CTTTTCCACCCAGCAACATCCTCCTGCCACGTCAGCGCTTCTGTCAGTCCCGAAAGCA  
 CTGCCACTCGCCATCGACTGCCTGCAACGGCTCCAGAAAGCCCTGAGAAACGGGTCCCGGA  
 AGTACCCTCCGCACCTGGTGGAGGTGGAGGCCATCCAGCACAAGACCACCCAGATTTTTCCAC  
 AAGGTCTACTTCCCTGATGACACTGACGAGGCCCTCGAAGTGGAGTCCAGCACCAAGGCCAA  
 GGACTTCTGCCAGAACATCGCCACCAGGCTGCTCCTCAAGTCCCTCAGAGGGATTTCAGCCTCT  
 TTGTCAAAATGTCAGACAAGGTCAATCAGCGTTCCCTGAGAATGACTTCTTCTTTGACTTTGTT  
 CGACTTGCAGACTGGATAAAGAAAGCTCGGCCATCAAGGACGGAATTGTGCCCTCACT  
 CACCTACCAGGTGTTCTCATGAAGAAGCTGTGGACCACCACGGTGCCAGGGAAGGATCCCA  
 TGGCCGATTCCATCTTCCACTATTACCAGGAGTTGCCCAAGTATCTCCGAGGCTACCACAAG  
 TGCACGCGGGAGGAGGTGCTGCAGCTGGGGGCGCTGATCTACAGGGTCAAGTTCCGAGGAGGA  
 CAAGTCCCTACTTCCCCAGCATCCCCAAGCTGCTGCGGGAGCTGGTGGCCCAAGGACCTTATCC  
 GGCAGGTCTCACCTGATGACTGGAAGCGGTCCATCGTFCGCCTACTTCAACAAGCACGCAGGG  
 AAGTCCAAGGAGGAGGCCAAGCTGGCCTTCTGAAAGTCACTTCAAGTGGCCACCTTTGG  
 CTCAGCCTTCTTCGAGGTGAAGCAAACCTACGGAGCCAACTTCCCTGAGATCCTCCTAATTG  
 CCATCAACAAGTATGGGGTCAGCCTCATCGATCCCAAAACGAAGGATATCCTCACCCTCAT  
 CCCTTACCAAGATCTCCAACCTGGAGCAGCGGCAACACCTACTTCCACATCACCATTGGGAA  
 CTTGGTGCAGGGAGCAAACCTGCTCTGCGAGACGTCCTGGGCTACAAGATGGATGACCTCC  
 TGACTTCTACATTAGCCAGATGCTCACAGCCATGAGCAAACAGCGGGGCTCCAGGAGCGGC  
 AAGTGA (SEQ ID No. 24)

**poliA de BGH**

GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCCT  
 GACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATGTCATCGCATT  
 GTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGAT  
 TGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGA (SEQ ID No. 25)

**3'ITR2**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGG  
TCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGG  
GTTCCCT (SEQ ID No. 4)

**ITR5 derecha**

TCACTGCTTACAAAACCCCTTGCTTGAGAGTGTGGCACTCTCCCCCTGTGCGTTCGCTC  
GCTCGCTGGCTCGTTTGGGGGGGCGACGGCCAGAGGGCGTCTGTCGAGCTCTTTGAGCT  
GCCACCCCCCAAACGAGCCAGCGAGCGAGCGAACGCGACAGGGGGGAGAG (SEQ ID No.  
14)

**Secuencia completa de pAAV2.1-MYO7A\_3'AK\_BGH**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTGGGGCGACCTTTGG  
TCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGG  
GTTCCCTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAG  
ATCGGAATTCGCCCTTTGATCAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGC  
TGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGTTTATAATTTTCAGGTGGC  
ATCTTTCGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTCTCTCCACAGGCAG  
CCCTGGCGGTCTGGATCACCATCCTCCGCTTCATGGGGGACCTCCCTGAGCCCAAGTACCAC  
ACAGCCATGAGTGATGGCAGTGAGAAGATCCCTGTGATGACCAAGATTTATGAGACCCTGGG  
CAAGAAAGACGTACAAGAGGGAGCTGCAGGCCCTGCAGGGCGAGGGCGAGGGCCAGCTCCCCG  
AGGGCCAGAAGAAGAGCAGTGTGAGGCACAAGCTGGTGCATTTGACTCTGAAAAAGAAGTCC  
AAGCTCACAGAGGAGGTGACCAAGAGGCTGCATGACGGGAGTCCACAGTGCAGGGCAACAG  
CATGCTGGAGGACCGCCACCTCCAACCTGGAGAAGCTGCACCTTCATCATCGGCAATGGCA  
TCCTGCGGCCAGCACTCCGGGACGAGATCTACTGCCAGATCAGCAAGCAGCTGACCCACAAC  
CCCTCCAAGAGCAGCTATGCCCGGGGCTGGATTCTCGTGTCTCTCTGCGTGGGCTGTTTCGC  
CCCCCTCAGAGAAGTTTGTCAAGTACCTGCGGAACCTTCATCCACGGGGGCCCGCCGGCTACG  
CCCCCTACTGTGAGGAGCGCCTGAGAAGGACCTTTGTCAATGGGACACGGACACAGCCGCC  
AGCTGGCTGGAGCTGCAGGCCACCAAGTCCAAGAAGCCAATCATGTTGCCCGTGACATTCAT  
GGATGGGACCACCAAGACCCTGCTGACGGACTCGGCAACCACGGCCAAGGAGCTCTGCAACG  
CGCTGGCCGACAAGATCTCTCTCAAGGACCGGTTTCGGGTTCTCCCTCTACATTGCCCTGTTT  
GACAAGGTGTCTCCCTGGGCAGCGGCAGTGACCACGTCATGGACGCCATCTCCCAGTGCGA  
GCAGTACGCCAAGGAGCAGGGCGCCAGGAGCGCAACGCCCCCTGGAGGCTCTTCTTCCGCA  
AAGAGGTCTTCACGCCCTGGCACAGCCCCCTCCGAGGACAACGTGGCCACCAACCTCATCTAC  
CAGCAGGTGGTGCAGGAGTCAAGTTTGGGGAGTACAGGTGTGAGAAGGAGGACGACCTGGC  
TGAGCTGGCCTCCAGCAGTACTTTGTAGACTATGGCTCTGAGATGATCCTGGAGCGCCTCC  
TGAACCTCGTGCCACCTACATCCCCGACCGCGAGATCACGCCCTGAAGACGCTGGAGAAG  
TGGGCCCAGCTGGCCATCGCCGCCACAAGAAGGGGATTTATGCCCAGAGGAGAAGTATGATGC  
CCAGAAGGTCAAAGAGGATGTGGTCAAGTTATGCCCGCTTCAAGTGGCCCTTGCTCTTCTCCA  
GGTTTTATGAAGCCTACAAATTCTCAGGCCCCAGTCTCCCCAAGAACGACGTCATCGTGGCC  
GTCAACTGGACGGGTGTGTACTTTGTGGATGAGCAGGAGCAGGTAATCTGGAGCTGTCCTT  
CCCAGAGATCATGGCCGTGTCCAGCAGCAGGGAGTGCCGTGTCTGGCTCTCACTGGGCTGCT  
CTGATCTTGGCTGTGCTGCGCCTCACTCAGGCTGGGCAGGACTGACCCCGCGGGGCCCTGT  
TCTCCGTGTTGGTCTGTCAGGGGAGCGAAAACGACGGCCCCCAGCTTCACGCTGGCCACCAT  
CAAGGGGGACGAATACACCTTCACCTCCAGTAATGCTGAGGACATTCGTGACCTGGTGGTCA  
CCTTCTAGAGGGGCTCCGGAAGAGATCTAAGTATGTTGTGGCCCTGCAGGATAACCCCAAC

5



CCCGCAGGCGAGGAGTCAGGCTTCCTCAGCTTTGCCAAGGGAGACCTCATCATCCTGGACCA  
 TGACACGGGCGAGCAGGTCATGAACTCGGGCTGGGCCAACGGCATCAATGAGAGGACCAAGC  
 AGCGTGGGGACTTCCCCACCGACTGTGTGTACGTCATGCCCACTGTCACCATGCCACCTCGT  
 GAGATTGTGGCCCTGGTCACCATGACTCCCGATCAGAGGCAGGACGTTGTCCGGCTCTTGCA  
 GCTGCGAACGGCGGAGCCCCGAGGTGCGTGCCAAGCCCTACACGCTGGAGGAGTTTTCTATG  
 ACTACTTCAGGCCCCACCCAAGCACACGCTGAGCCGTGTCATGGTGTCCAAGGCCCGAGGC  
 AAGGACCGGCTGTGGAGCCACACGCGGGAACCGCTCAAGCAGGCGCTGCTCAAGAAGCTCCT  
 GGGCAGTGAGGAGCTCTCGCAGGAGGCCTGCCTGGCCTTCATTGCTGTGCTCAAGTACATGG  
 GCGACTACCCGTCCAAGAGGACACGCTCCGTCAATGAGCTCACCGACCAGATCTTTGAGGGT  
 CCCCTGAAAGCCGAGCCCCTGAAGGACGAGGCATATGTGCAGATCCTGAAGCAGCTGACCGA  
 CAACCACATCAGGTACAGCGAGGAGCGGGGTTGGGAGCTGCTCTGGCTGTGCACGGGCCCTT  
 TCCCACCCAGCAACATCCTCCTGCCCCACGTGCAGCGCTTCTGTCAGTCCCGAAAGCACTGC  
 CCACTCGCCATCGACTGCCTGCAACGGCTCCAGAAAGCCCTGAGAAACGGGTCCCAGGAAGTA  
 CCCTCCGCACCTGGTGGAGGTGGAGGCCATCCAGCACAAGACCACCCAGATTTTTCCACAAGG  
 TCTACTTCCCTGATGACACTGACGAGGCCCTCGAAGTGGAGTCCAGCACCAAGGCCAAGGAC  
 TTCTGCCAGAACATCGCCACCAGGCTGCTCCTCAAGTCCCTCAGAGGGATTACGCCCTTTTGT  
 CAAAATTGCAGACAAGGTCATCAGCGTTCCCTGAGAATGACTTCTTCTTTGACTTTTGTTCGAC  
 ACTTGACAGACTGGATAAAGAAAGCTCGGGCCATCAAGGACGGAATTGTGCCCTCACTCACC  
 TACCAGGTGTTCTTCATGAAGAAGCTGTGGACCACCACGGTGCCAGGGAAGGATCCCATGGC  
 CGATTCCATCTTCCACTATTACCAGGAGTTGCCCAAGTATCTCCGAGGCTACCACAAGTGCA  
 CGCGGGAGGAGGTGCTGCAGCTGGGGGCGCTGATCTACAGGGTCAAGTTCGAGGAGGACAAG  
 TCCTACTTCCCCAGCATCCCCAAGCTGCTGCGGGAGCTGGTGGCCCAAGGACCTTATCCGGCA  
 GGTCTCACCTGATGACTGGAAGCGGTCCATCGTCGCCTACTTCAACAAGCACGCAGGGAAGT  
 CCAAGGAGGAGGCCAAGCTGGCCTTCTGAAGTCTATCTTCAAGTGGCCACCTTTGGCTCA  
 GCCTTCTTCGAGGTGAAGCAAACACTACGGAGCCAACTTCCCTGAGATCCTCCTAATTGCCAT  
 CAACAAGTATGGGGTCAGCCTCATCGATCCCAAAACGAAGGATATCCTCACCACCTCATCCCT  
 TCACCAAGATCTCCAAGTGGAGCAGCGGCAACACCTACTTCCACATCACCATTGGGAACTTG  
 GTGCGCGGGAGCAAACCTGCTCTGCGAGACGTCACTGGGCTACAAGATGGATGACCTCCTGAC  
 TTCTTACATTAGCCAGATGCTCACAGCCATGAGCAAACAGCGGGGCTCCAGGAGCGGCAAGT  
 GACCGCGGCCCTGCTCCGGCTCTGCGGCCCTTCCGCGTCTTCGAGATCTGCCTCGATGTG  
 CCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGG  
 TGCCACTCCCCTGCTCTTCCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTTGTCTGAGTAGGT  
 GTCATTTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAAT  
 AGCAGGCATGCTGGGGACTCGAGTTAAGGGCGCAATTCGCGATTAGGATCTTCCCTAGAGCAT  
 GGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGA  
 GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCC  
 GACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID No. 26)

**pAAV2.1-CBA-MYO7A\_5'TS**

**Secuencia completa**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG  
 TCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGG  
 GTTCCCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAG  
 ATCCTAATCGGGAATTGCCCCCTAAGCTAGCGTGCCACCTGGTGCACATTGATTATTGACTA  
 GTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTT  
 ACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTC  
 AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG  
 ACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCC  
 CCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAAGTACATGACCTTATG

GGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTTCGAGGTG  
AGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTT  
ATTTATTTTTTTAATTATTTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGC  
GGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGGCGGAGCCAATCA  
GAGCGGGCGGCTCCGAAAGTTTTCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGGCGGGCCCTATAAAA  
AGCGAAGCGCGCGGGCGGGCTGCAGAAGTTGGTTCGTGAGGCACTGGGCAGGTAAGTATCA  
AGGTTACAAGACAGGTTTAAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTTCGAGACAGAGAAGACTC  
TTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCTTTTCTCTCCACAGG  
TGTCCAGGCGGCCCATGGTGATTCTTCAGCAGGGGGACCATGTGTGGATGGACCTGAGAT  
TGGGGCAGGAGTTCGACGTGCCCATCGGGGCGGTGGTGAAGCTCTGCGACTCTGGGCAGGT  
CAGGTGGTGGATGATGAAGACAATGAACACTGGATCTCTCCGAGAACGCAACGCACATCAA  
GCCTATGCACCCACGTCGGTCCACGGCGTGGAGGACATGATCCGCTGGGGGACCTCAACG  
AGGCGGGCATCTTGCACAACCTGCTTATCCGCTACCGGGACCACCTCATCTACACGTATACG  
GGCTCCATCCTGGTGGCTGTGAACCCCTACCAGCTGCTCTCCATCTACTCGCCAGAGCACAT  
CCGCCAGTATAACCAACAAGAAGATTGGGGAGATGCCCCCCACATCTTTGCCATTGCTGACA  
ACTGCTACTTCAACATGAAACGCAACAGCCGAGACCAGTGTGCATCATCAGTGGGGAATCT  
GGGGCGGGAAGACGGAGAGCACAAAGCTGATCCTGCAGTTTCTGGCAGCCATCAGTGGGCA  
GCACTCGTGGATTGAGCAGCAGGTCTTGGAGGCCACCCCAATCTGGAAGCATTTGGGAATG  
CCAAGACCATCCGCAATGACAACCTCAAGCCGTTTTCGAAAGTACATCGACATCCACTTCAAC  
AAGCGGGGCGCCATCGAGGGCGGAAGATTGAGCAGTACCTGCTGGAAAAGTCACGTGTCTG  
TCGCCAGGCCCTGGATGAAAGGAACTACCACGTGTTCTACTGCATGCTGGAGGGCATGAGTG  
AGGATCAGAAGAAGAAGCTGGGCTTGGGCCAGGCCTCTGACTACAACACTTGGCCATGGGT  
AACTGCATAACCTGTGAGGGCCGGGTGGACAGCCAGGAGTACGCCAACATCCGCTCCGCCAT  
GAAGGTGCTCATGTTCACTGACACCGAGAACTGGGAGATCTCGAAGCTCCTGGCTGCCATCC  
TGCACCTGGGCAACCTGCAGTATGAGGCACGCACATTTGAAAACCTGGATGCCTGTGAGGTT  
CTCTTCTCCCCATCGTCCAGTACAGCTGCATCCCTGCTTGAGGTGAACCCCCCAGACCTGAT  
GAGTGCCTGACTAGCCGCACCCCTCATCACCCGCGGGGAGACGGTGTCCACCCCACTGAGCA  
GGGAACAGGCACTGGACGTGCGCGACGCTTCGTAAAGGGGATCTACGGGCGGCTGTTCTGTG  
TGGATTGTGGACAAGATCAACGCAGCAATTTACAAGCCTCCCTCCCAGGATGTGAAGAATC  
TCGCAGGTCCATCGGCCTCCTGGACATCTTTGGGTTTGAAGACTTTGCTGTGAACAGCTTTG  
AGCAGCTCTGCATCAACTTCGCCAATGAGCACCTGCAGCAGTTCTTTGTGCGGCACGTGTTT  
AAGCTGGAGCAGGAGGAATATGACCTGGAGAGCATTTGACTGGCTGCACATCGAGTTCACTGA  
CAACCAGGATGCCCTGGACATGATTGCCAACAAGCCCATGAACATCATCTCCCTCATCGATG  
AGGAGAGCAAGTTCCCCAAGGGCACAGACACCACCATGTTACACAAGCTGAACTCCCAGCAC  
AAGCTCAACGCCAACTACATCCCCCCCCAAGAACAACCATGAGACCCAGTTTGGCATCAACCA  
TTTTTGCAGGCATCGTCTACTATGAGACCCAAAGGCTTCTTGGAGAAGAACCAGACACCCCTGC  
ATGGGGACATTATCCAGCTGGTCCACTCCTCCAGGAACAAGTTTCATCAAGCAGATCTTCCAG  
GCCGATGTGCGCCATGGGCGCCGAGACCAGGAAGCGCTCGCCCACTTAGCAGCCAGTTCAA  
GCGGTCACTGGAGCTGCTGATGCGCACGCTGGGTGCCTGCCAGCCCTTCTTTGTGCGATGCA  
TCAAGCCCAATGAGTTCAAGAAGCCCATGCTGTTTCGACCGGCACCTGTGCGTGCGCCAGCTG  
CGGTACTCAGGAATGATGGAGACCATCCGAATCCGCGAGCTGGCTACCCCATCCGCTACAG  
CTTCGTAGAGTTTGTGGAGCGGTACCGTGTGCTGCTGCCAGGTGTGAAGCCGGCCTACAAGC  
AGGGCGACCTCCGCGGACTTGGCAGCGCATGGCTGAGGCTGTGCTGGGCACCCACGATGAC  
TGGCAGATAGGCAAAAACCAAGATCTTTCTGAAGGACCACCATGACATGCTGCTGGAAGTGA  
GCGGGACAAAGCCATCACCGACAGAGTCATCCTCCTTCAGAAAAGTCATCCGGGGATTCAAAG  
ACAGGTCTAACTTTCTGAAGCTGAAGAACGCTGCCACACTGATCCAGAGGCACTGGCGGGGT  
CACAACCTGTAGGAAGAATAACGGGCTGATGCGTCTGGGCTTCTGCGGCTGCAGGCCCTGCA  
CCGCTCCCAGGAGCTGCACCAGCAGTACCGCCTGGCCCCAGCGCATCATCCAGTTCCAGG  
CCCGCTGCCGCGCTATCTGGTGCACAAGGCCTTCCGCCACCGCCTCTGGGCTGTGCTCACC  
GTGCAGGCCTATGCCCGGGGCGATGATCGCCCGCAGGCTGCACCAACGCCTCAGGGCTGAGTA  
TCTGTGGCGCCTCGAGGCTGAGAAAATGCGGCTGGCGGAGGAAGAGAAGCTTCGGAAGGAGA

TGAGCGCCAAGAAGGCCAAGGAGGAGGCCGAGCGCAAGCATCAGGAGCGCCTGGCCCAGCTG  
 GCTCGTGAGGACGCTGAGCGGGAGCTGAAGGAGAAGGAGGCCGCTCGGCGGAAGAAGGAGCT  
 CCTGGAGCAGATGGAAAGGGCCCCGCATGAGCCTGTCAATCACTCAGACATGGTGGACAAGA  
 TGTTTGGCTTCTGGGACTTCAGGTGGCCTGCCAGGCCAGGAGGGCCAGGCACCTAGTGGC  
 TTTGAGGACCTGGAGCGAGGGCGGAGGGAGATGGTGGAGGAGGACCTGGATGCAGCCCTGCC  
 CCTGCCGACGAGGATGAGGAGGACCTCTCTGAGTATAAAATTTGCCAAGTTCGCGGCCACCT  
 ACTTCCAGGGGACAACCTACGCACTCCTACACCCGGCGGCCACTCAAACAGCCACTGCTCTAC  
 CATGACGACGAGGGTACCAGCTGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCA  
 ATAGAAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAGACTCTTGCCTTCTCAATTGAAGGGCGAATTC  
 CGATCTTCTAGAGCATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAG  
 GAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG  
 GCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC  
 GCAG (SEQ ID No. 27)

**pAAV2.1-MYO7A\_3'TS\_BGH**

**Secuencia completa**

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGG  
 TCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGG  
 GTTCTTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACGTAGCCATGCTCTAGGAAG  
 ATCGGAATTCGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCCTTCTCTCCACAGG  
 CAGCCCTGGCGGTCTGGATCACCATCTCCGCTTCATGGGGGACCTCCCTGAGCCCAAGTAC  
 CACACAGCCATGAGTGATGGCAGTGAGAAGATCCCTGTGATGACCAAGATTTATGAGACCCT  
 GGGCAAGAAGACGTACAAGAGGGAGCTGCAGGCCCTGCAGGGCGAGGGCGAGGCCAGCTCC  
 CCGAGGGCCAGAAGAAGAGCAGTGTGAGGCCACAAGCTGGTGCATTTGACTCTGAAAAAGAAG  
 TCCAAGCTCACAGAGGAGGTGACCAAGAGGCTGCATGACGGGGAGTCCACAGTGCAGGGCAA  
 CAGCATGCTGGAGGACCGGCCACCTCCAACCTGGAGAAGCTGCACTTCATCATCGGCAATG  
 GCATCTGCGGCCAGCACTCCGGGACGAGATCTACTGCCAGATCAGCAAGCAGCTGACCCAC  
 AACCCCTCCAAGAGCAGTATGCCCGGGGCTGGATTCTCGTGTCTCTCTGCGTGGGCTGTTT  
 CGCCCCCTCCGAGAAGTTTGTCAAGTACCTGCGGAACCTTCATCCACGGGGGCCCGCGCT  
 ACGCCCCGTACTGTGAGGAGCGCCTGAGAAGGACCTTTGTCAATGGGACACGGACACAGCCG  
 CCCAGTGGCTGGAGCTGCAGGCCACCAAGTCCAAGAAGCCAATCATGTTGCCCGTGACATT  
 CATGGATGGGACCACCAAGACCCTGCTGACGGACTCGGCAACCACGGCCAAGGAGCTCTGCA  
 ACGCGCTGGCCGACAAGATCTCTCTCAAGGACCGGTTTCGGGTTCTCCCTCTACATTGCCCTG  
 TTTGACAAAGGTGTCTCCCTGGGCAGCGGCAGTGACCACGTCATGGACGCCATCTCCAGTG  
 CGAGCAGTACGCCAAGGAGCAGGGCGCCCAGGAGCGCAACGCCCCCTGGAGGCTCTTCTTCC  
 GCAAAGAGGTCTTACGCCCCTGGCACAGCCCCCTCCGAGGACAACGTGGCCACCAACCTCATC  
 TACCAGCAGGTGGTGCAGGAGTCAAGTTTGGGGAGTACAGGTGTGAGAAGGAGGACGACCT  
 GGCTGAGCTGGCCTCCCAGCAGTACTTTGTAGACTATGGCTCTGAGATGATCCTGGAGCGCC  
 TCCTGAACCTCGTGCCACCTACATCCCCGACCGCGAGATCACGCCCCGAAGACGCTGGAG  
 AAGTGGGCCAGCTGGCCATCGCCGCCACAAGAAGGGGATTTATGCCAGAGGAGAAGTGA  
 TGCCAGAAAGGTCAAAGAGGATGTGGTCAAGTTATGCCCGCTTCAAGTGGCCCTTGCTCTTCT  
 CCAGGTTTTATGAAGCCTACAAATCTCAGGCCCCAGTCTCCCCAAGAACGACGTCATCGTG  
 GCCGTCAACTGGACGGGTGTGTAATTTGTGGATGAGCAGGAGCAGGTAATCTGGAGCTGTC  
 CTTCCCAGAGATCATGGCCGTGTCCAGCAGCAGGGAGTGCCGTGTCTGGCTCTCACTGGGCT  
 GCTCTGATCTTGGCTGTGCTGCGCCTCACTCAGGCTGGGCAGGACTGACCCCGCGGGGCC  
 TGTTCTCCGTGTTGGTCTTGCAGGGGAGCGAAAACGACGGCCCCAGCTTCACGCTGGCCAC  
 CATCAAGGGGACGAATACACCTTACCTCCAGTAATGCTGAGGACATTCGTGACCTGGTGG  
 TCACCTTCTAGAGGGGCTCCGGAAGAGATCTAAGTATGTTGTGGCCCTGCAGGATAACCC  
 AACCCCGCAGGCGAGGAGTCAAGCTTCTCAGCTTTGCCAAGGGAGACCTCATCATCCTGGA  
 CCATGACACGGGCGAGCAGGTCATGAACCTCGGGCTGGGCCAACGGCATCAATGAGAGGACCA

AGCAGCGTGGGGACTTCCCCACCGACTGTGTGTACGTCATGCCACTGTCACCATGCCACCT  
 CGTGAGATTGTGGCCCTGGTCACCATGACTCCCGATCAGAGGCAGGACGTTGTCCGGCTCTT  
 GCAGCTGCGAACGGCGGAGCCCGAGGTGCGTGCCAAGCCCTACACGCTGGAGGAGTTTTCTT  
 ATGACTACTTCAGGCCCCACCCAAGCACACGCTGAGCCGTGTCATGGTGTCCAAGGCCCGA  
 GGCAAGGACCGGCTGTGGAGCCACACGCGGGAACCGCTCAAGCAGGCGCTGCTCAAGAAGCT  
 CCTGGGCAGTGAGGAGCTCTCGCAGGAGGCCTGCCTGGCCTTCATTGCTGTGCTCAAGTACA  
 TGGGCGACTACCCGTCCAAGAGGACACGCTCCGTCAATGAGCTCACCGACCAGATCTTTGAG  
 GGTCCCCTGAAAGCCGAGCCCTGAAGGACGAGGCATATGTGCAGATCCTGAAGCAGCTGAC  
 CGACAACCACATCAGGTACAGCGAGGAGCGGGGTTGGGAGCTGCTCTGGCTGTGCACGGGCC  
 TTTTCCCACCCAGCAACATCCTCCTGCCCCACGTGCAGCGCTTCTGCAGTCCCGAAAGCAC  
 TGCCCACTCGCCATCGACTGCCTGCAACGGCTCCAGAAAGCCCTGAGAAACGGGTCCCGGAA  
 GTACCCTCGCGACCTGGTGGAGGTGGAGGCCATCCAGCACAAAGACCACCCAGATTTTTCCACA  
 AGGTCTACTTCCCTGATGACACTGACGAGGCCTTCGAAGTGGAGTCCAGCACCAAGGCCAAG  
 GACTTCTGCCAGAACATCGCCACCAGGCTGCTCCTCAAGTCTCAGAGGGATTTCAGCCTCTT  
 TGTCAAAATTGCAGACAAGGTTCATCAGCGTTCCCTGAGAATGACTTCTTCTTTGACTTTGTTT  
 GACACTTGACAGACTGGATAAAGAAAGCTCGGCCCATCAAGGACGGAATTGTGCCCTCACTC  
 ACCTACCAGGTGTTCTTTCATGAAGAAGCTGTGGACCACCACGGTGCCAGGGAAGGATCCCAT  
 GGCCGATTCCATCTTCCACTATTACCAGGAGTTGCCCAAGTATCTCCGAGGCTACCACAAGT  
 GCACGCGGGAGGAGGTGCTGCAGCTGGGGGCGCTGATCTACAGGGTCAAGTTCGAGGAGGAC  
 AAGTCTTACTTCCCAGCATCCCCAAGCTGCTGCGGGAGCTGGTGCCCCAGGACCTTATCCG  
 GCAGGTCTCACCTGATGACTGGAAGCGGTCCATCGTCGCCTACTTCAACAAGCACGCAGGGA  
 AGTCCAAGGAGGAGGCCAAGCTGGCCTTCCCTGAAGCTCATCTTCAAGTGGCCCACCTTTGGC  
 TCAGCCTTCTTCGAGGTGAAGCAAACACTACGGAGCCAAACTTCCCTGAGATCCTCCTAATTGC  
 CATCAACAAGTATGGGGTACGCTCATCGATCCCAAAACGAAGGATATCCTCACCCTCATC  
 CCTTACCAAGATCTCCAAGTGGAGCAGCGGCAACACCTACTTCCACATCACCATTGGGAAC  
 TTGGTGCAGCGGGAGCAAACCTGCTCTGCGAGACGTCACTGGGCTACAAGATGGATGACCTCCT  
 GACTTCTTACATTAGCCAGATGCTCACAGCCATGAGCAAACAGCGGGGCTCCAGGAGCGGCA  
 AGTGACCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTTCCCGCTCTTCGAGATCTGCCTCGACT  
 GTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGGCCCTTCCCGCTTCCCTTGACCCTGGA  
 AGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTA  
 GGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAC  
 AATAGCAGGCATGCTGGGGACTCGAGTTAAGGGCGCAATTCCCGATTAGGATCTTCTTAGAG  
 CATGGCTACGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACATAAGGAACCCCTAGTGAT  
 GGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCCG  
 CCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID No.  
 28)

**AP**

GTGATCCTAGGTGGAGGCCGAAAGTACATGTTTCGCATGGGAACCCAGACCCTGAGTACCC  
 AGATGACTACAGCCAAGGTGGGACCAGGCTGGACGGGAAGAATCTGGTGCAGGAATGGCTGG  
 CGAAGCGCCAGGGTGCCCGGTACGTGTGGAACCGCACTGAGCTCATGCAGGCTTCCCTGGAC  
 CCGTCTGTGACCCATCTCATGGGTCTCTTTGAGCCTGGAGACATGAAATACGAGATCCACCG  
 AGACTCCACACTGGACCCCTCCCTGATGGA (SEQ ID No. 29)

**Marcador 3Xflag**

5 GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGACTACAAGGATGACGATGA  
 CAAG (SEQ ID No. 30)

**HA**

ATGTATGATGTTCTGATTATGCTAGCCTC (SEQ ID NO:31)

10 Para los fines de esta invención, una secuencia codificadora de ABCA4, MYO7A y CEP290, que preferiblemente se  
 seleccionan respectivamente de las secuencias incluidas en la presente, o las secuencias que codifican la misma  
 secuencia de aminoácidos debido a la degeneración del código genético, está unida funcionalmente a una  
 secuencia de promotor capaz de regular su expresión en una célula retiniana de mamífero, en particular en células  
 de fotorreceptores. Los promotores adecuados que pueden usarse según la invención incluyen el promotor de  
 citomegalovirus, el promotor de rodopsina, el promotor de rodopsina quinasa, el promotor de la proteína de unión a  
 retinoides interfotorreceptores, el promotor de la distrofia macular viteliforme de tipo 2, sus fragmentos y variantes,

que conservan la actividad de promotor de la transcripción.

Los sistemas de suministro víricos incluyen, pero no se limitan a vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados (AAV), vectores de AAV pseudotipificados, vectores de herpes virus, vectores retrovíricos, vectores lentivíricos, vectores baculovíricos. Los vectores de AAV pseudotipificados son los que contienen el genoma de un serotipo de AAV en la cápsida de un segundo serotipo de AAV; por ejemplo, un vector AAV2/8 contiene la cápsida de AAV8 y el genoma de AAV2 (Auricchio *et al.* (2001), *Hum. Mol. Genet.*, 10(26):3075-3081). Dichos vectores también se conocen como vectores quiméricos. Otros ejemplos de sistemas de suministro incluyen los sistemas de suministro *ex vivo*, que incluyen, pero no se limitan a métodos de transfección de ADN, tales como electroporación, biolística de ADN, transfección mediada por lípidos, transfección mediada por ADN compactado.

La construcción de un vector de AAV puede realizarse siguiendo procedimientos y empleando técnicas que son conocidos por los expertos en la técnica. La teoría y la práctica para la construcción de un vector vírico adenoasociado y su uso en terapia se ilustra en varias publicaciones científicas y de patente (en la presente se incorpora la siguiente bibliografía como referencia: Flotte T.R., Adeno-associated virus-based gene therapy for inherited disorders, *Pediatr Res*, diciembre de 2005, 58(6):1143-1147; Goncalves M.A., Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector, *Virol J.*, 6 de mayo de 2005, 2:43; Surace E.M., Auricchio A., Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer, *Prog Retin Eye Res.*, noviembre de 2003, 22(6):705-719; Mandel R.J., Manfredsson F.P., Foust K.D., Rising A., Reimsnider S., Nash K., Burger C., Recombinant adeno-associated viral vectors as therapeutic agents to treat neurological disorders, *Mol Ther.*, marzo de 2006, 13(3):463-483).

Las formas de administración adecuadas de una composición farmacéutica que contiene vectores de AAV incluyen, pero no se limitan a disoluciones o suspensiones inyectables, lociones oculares y ungüentos oftálmicos. En una realización preferida, el vector de AAV se administra mediante inyección subretiniana, por ejemplo, mediante inyección en el espacio subretiniano, en la cámara anterior o en el espacio retrobulbar. Preferiblemente, los vectores víricos se administran mediante una estrategia subretiniana (según se describe en Bencicelli J., *et al.*, *Mol Ther.*, 22 de enero de 2008, Reversal of Blindness in Animal Models of Leber Congenital Amaurosis Using Optimized AAV2-mediated Gene Transfer).

La dosis del virus para su uso en terapia se determinará según el caso, y depende de la vía de administración, la gravedad de la enfermedad, las condiciones generales del paciente y otros parámetros clínicos. En general, las dosificaciones adecuadas variarán de  $10^8$  a  $10^{13}$  vg (genomas de vector)/ojo.

#### *Producción del vector de AAV*

Se produjeron vectores de AAV por TIGEM AAV Vector Core mediante transfección triple de células HEK293, seguido de dos rondas de purificación con CsCl<sub>2</sub> (54). Para cada preparación vírica se determinaron las titulaciones físicas [copias de genoma ("genome copies", GC)/ml] promediando la titulación obtenida mediante un análisis de transferencia por puntos (55) y mediante cuantificación con PCR empleando TaqMan (54) (Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

#### *Infección con AAV de células HEK293*

Se mantuvieron células HEK293 en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero bovino fetal al 10 % y L-glutamina 2 mM (GIBCO, Invitrogen S.R.L., Milán, Italia). Las células se cultivaron en placas de seis pocillos a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/pocillo y se transfectaron 16 horas después con 1,3  $\mu$ g de plásmido auxiliar pDeltaF6 que contiene los genes auxiliares Ad (56) usando el método del fosfato de calcio. Después de 5 horas, las células se lavaron una vez con DMEM y se incubaron con vectores AAV2/2 (m.o.i.:  $10^5$  GC/célula de cada vector; la coinfección 1:1 con vectores de AAV duales produjo  $2 \times 10^5$  GC totales/célula) en un volumen final de 700  $\mu$ l de DMEM sin suero. Dos horas después se añadieron 2 ml de DMEM completo a las células. Las células se recolectaron 72 horas después de la infección para el análisis de la transferencia Western.

#### *Modelos animales*

Este estudio se realizó según la guía de NIH para el cuidado y uso de animales de laboratorio, la declaración de the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research, y las leyes del Ministerio de Salud italiano para procedimientos con animales. Los ratones se alojaron en el vivario del Instituto de Genética y Biofísica (Nápoles, Italia) y se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz/oscuridad (exposición de 10-50 lux durante la fase de luz). Los ratones C57BL/6 y BALB/c se adquirieron en Harlan Italy SRL (Udino, Italia). Se generaron ratones *Abca4*<sup>-/-</sup> albinos mediante cruzamientos y retrocruzamientos sucesivos con ratones BALB/c (homocigóticos para Rpe65 Leu450) (57) y se mantuvieron endogámicos. El cruzamiento se realizó apareando ratones homocigóticos. Los ratones *sh14626SB/4626SB* pigmentados (denominados *sh1*<sup>-/-</sup>) se importaron de the Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, Reino Unido, un amable obsequio de la doctora Karen Steel) y se retrocruzaron dos veces con ratones CBA/Ca adquiridos en Harlan Italy SRL (Udino, Italia) para obtener ratones *sh1*<sup>+/-</sup>/*4626SB* heterocigóticos (denominados *sh1*<sup>+/-</sup>) para expandir la colonia. Los ratones se mantuvieron endogámicos; el cruzamiento se realizó apareando hembras heterocigóticas con machos heterocigóticos. Los ratones *sh1* pigmentados usados en este estudio estaban afectados por Usher 1B (*sh1*<sup>-/-</sup>) o no estaban afectados (*sh1*<sup>+/-</sup> y *sh1*<sup>+/+</sup>). Se realizó el genotipo para el alelo MYO7A<sup>4626SB</sup> mediante una

análisis con PCR del ADN genómico (extraído de la punta de la cola del ratón), seguido de la secuenciación del ADN. Los cebadores utilizados para la amplificación con PCR fueron los siguientes: Fw1 (GTGGAGCTTGACATCTACTTGACC) y Rev3 (AGCTGACCCTCATGACTCTGC), que generan un producto de 712 pb que se secuenció con el cebador Fw1. Los cerdos hembra Large White usados en este estudio se registraron como animales de pura raza en LWHerD Book de la Asociación Nacional de Criadores de Cerdos italiana (Azienda Agricola Pasotti, Imola, Italia).

#### *Inyección subretiniana de vectores de AAV en ratones y cerdos*

Se anestesiaron ratones (de 4-5 semanas de edad) con una inyección intraperitoneal de 2 ml/100 g de peso corporal de avertina [1,25 % en p/v de 2,2,2-tribromoetanol y 2,5 % en v/v de 2-metil-2-butanol (Sigma-Aldrich, Milán, Italia)] (58), y después se administraron subretinariamente los vectores AAV2/8 mediante una estrategia transcoroidal transesclerótica, según describen Liang *et al.* (59). Todos los ojos se trataron con 1 µl de disolución de vector. Las dosis de AAV2/8 (GC/ojo) administradas varían a través de los diferentes experimentos con ratones, según se describe en la sección de "Resultados". Se añadió AAV2/1-CMV-tirosinasa humana (60) (dosis:  $2 \times 10^8$  GC/ojo) o AAV2/5-CMV-EGFP (que codifica EGFP de tamaño normal, dosis:  $4 \times 10^8$  GC/ojo) a la disolución del vector AAV2/8 que se administró subretinariamente a ratones albinos (*Abca4*<sup>-/-</sup> y BALB/c) (figura 6B, 7-8) o *sh1* pigmentados (figura 10-11), respectivamente. Esto permite marcar el RPE dentro de la parte transducida de la copa ocular, que después se diseccionó y se analizó (figura 6B, 7-8, 10-11). La administración subretiniana de los vectores de AAV a la retina de los cerdos se realizó como se ha descrito previamente (11). Todos los ojos se trataron con 100 µl de la disolución del vector AAV2/8. La dosis de AAV2/8 fue de  $1 \times 10^{10}$  (figura 3B) o de  $1 \times 10^{11}$  GC de cada vector/ojo (figura 5B y 16), y la coinyección de los vectores de AAV duales produjo una dosis total de  $2 \times 10^{10}$  GC/ojo o de  $2 \times 10^{11}$  GC/ojo, respectivamente.

#### *Análisis de la transferencia Western*

Se lisaron muestras (células HEK293, retinas o copas oculares) para el análisis de la transferencia Western con tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, NP40 al 1 %, Na-desoxicolato al 0,5 %, EDTA 1 mM, pH 8,0, SDS al 0,1 %) para extraer las proteínas EGFP y MYO7A, o con tampón SIE (sacarosa 250 mM, imidazol 3 mM, pH 7,4, etanol al 1 %, y NP-40 al 1 %) para extraer la proteína ABCA4.

Las muestras de cerdo (las áreas tratadas de la retina, así como láminas de RPE completas) se lisaron con tampón RIPA para extraer la MYO7A de las láminas de RPE, y con tampón SIE para extraer MYO7A y ABCA4 de las retinas.

Los tampones de lisis fueron suplementados con inhibidores de proteasas (comprimidos de cóctel de inhibidores Complete Protease, Roche, Milán, Italia) y fenilmetilsulfonilo 1 mM. Después de la lisis, las muestras de EGFP y MYO7A se desnaturalizaron a 99 °C durante 5 minutos en tampón de muestras 1X Laemli; las muestras de ABCA4 se desnaturalizaron a 37 °C durante 15 minutos en tampón de muestras 1X Laemli suplementado con urea 4 M. Los lisados se separaron mediante una electroforesis en gel de SDS al 7% (muestras de ABCA4 y MYO7A) o 12% (muestras de EGFP)-poliacrilamida. Los anticuerpos usados para las inmunotransferencias fueron los siguientes: anti-EGFP (sc-8334, Santa Cruz, Dallas, Texas, EE. UU., 1:500); anti-3xflag (A8592, Sigma-Aldrich, 1:1000); anti-Myo7a (policlonal, Primm Srl, Milán, Italia, 1:500) generado usando un péptido que se corresponde con los aminoácidos 941-1070 de la proteína MYO7A humana; anticuerpo anti-HA (PRB-101P-200, HA.11, Covance, Princeton, NJ, EE. UU., 1:2000); anti-β-tubulina (T5201, Sigma Aldrich, 1:10000); anti-filamina A (n.º de catálogo 4762, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EE. UU., 1:1000); anti-disferlina (disferlina, clon Ham1/7B6, MONX10795, Tebu-bio, Le Perray-en-Yveline, Francia, 1:500). La cuantificación de las bandas de EGFP, ABCA4 y MYO7A detectadas por la transferencia Western se realizó empleando el programa informático ImageJ (puede descargarse de modo gratuito en <http://rsbweb.nih.gov/ij/>). La expresión de ABCA4 y MYO7A se normalizó a filamina A o disferlina para los experimentos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. La expresión de EGFP se normalizó a β-tubulina o µg de proteínas para los experimentos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Se emplearon diferentes proteínas para la normalización basándose en la similitud de su peso molecular con el de diferentes productos transgénicos.

#### *Fotografía del fondo del ojo*

La formación de imágenes en vivo del fondo del ojo se realizó dilatando el ojo de C57BL/6 con una gota de tropicamida al 1 % (Visufarma, Roma, Italia) y la posterior estimulación del ojo con un destello de 300 W. Las fotografías del fondo del ojo se tomaron utilizando una cámara retiniana Topcon TRC-50IX conectada a una cámara digital Nikon D1H con dispositivo acoplado a carga (Topcon Medical System, Oakland, NJ, EE. UU.).

#### *Histología, microscopía óptica y de fluorescencia*

Para evaluar la expresión de EGFP en secciones histológicas, se enuclearon los ojos de ratones C57BL/6 o de cerdos Large White (11) un mes después de la inyección de AAV2/8. Los ojos de los ratones se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante la noche y se infiltraron con sacarosa al 30 % durante la noche; después la córnea y el cristalino se diseccionaron, y las copas oculares se introdujeron en un compuesto de temperatura de corte óptima ("optimal cutting temperature compound", matriz O.C.T., Kaltek, Padua, Italia). Los ojos de los cerdos se

fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 48 horas, se infiltraron con sacarosa al 10 % durante 4 horas, con sacarosa al 20 % durante 4 horas y, por último, con sacarosa al 30 % durante la noche. Después, la córnea, el cristalino y el cuerpo vítreo se diseccionaron y las porciones positivas a EGFP de las copas oculares se introdujeron en un compuesto de temperatura de corte óptima (matriz O.C.T., Kaltex). Se cortaron criosecciones en serie (espesor de 10  $\mu\text{m}$ ) a lo largo del meridiano horizontal y se distribuyeron progresivamente sobre portaobjetos. Se capturaron fotografías de histología retiniana utilizando una cámara Zeiss Axiocam (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania). Para analizar la localización de los melanosomas en el RPE de los ratones *sh1* pigmentados, los ojos se enuclearon 2 meses después de la inyección de AAV, se fijaron en glutaraldehído al 2 %-paraformaldehído al 2 % en tampón fosfato 0,1 M durante la noche, se enjuagaron en tampón fosfato 0,1 M, y se diseccionaron bajo un microscopio de fluorescencia. Las porciones positivas a EGFP de las copas oculares se introdujeron en Araldite 502/EMbed 812 (n.º de catálogo 13940, Araldite 502/EMbed 812 KIT, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EE. UU.). Se cortaron transversalmente secciones semidelgadas (0,5  $\mu\text{m}$ ) en un ultratomo Leica Ultratome RM2235 (Leica Microsystems, Bannockburn, IL, EE. UU.), se montaron sobre portaobjetos, y se tiñeron con tinte de tejidos Epoxy (n.º de catálogo 14950, Electron Microscopy Sciences). Los melanosomas fueron contados por un operario con mascarilla que analiza 10 campos diferentes/ ojo bajo un microscopio óptico con una magnificación de 100X. Las fotos retinianas se capturaron utilizando una cámara Zeiss Axiocam (Carl Zeiss).

#### *Microscopía electrónica e inmunomarcaje con oro*

Para los análisis con microscopía electrónica, se recolectaron los ojos de ratones *Abca4*<sup>-/-</sup> o *sh1* a los 3 y 2 meses después de la inyección con AAV, respectivamente. Los ojos se fijaron en glutaraldehído al 0,2 %-paraformaldehído al 2 % en tampón PHEM 0,1 M, pH 6,9 (PIPES 240 mM, HEPES 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, EGTA 40 mM) durante 2 horas y después se enjuagaron en tampón PHEM 0,1 M. Después los ojos se diseccionaron bajo un microscopio óptico o de fluorescencia para seleccionar las porciones positivas a tirosinasa o EGFP de las copas oculares de ratones albinos (*Abca4*<sup>-/-</sup> y BALB/c) y *sh1* pigmentados, respectivamente. La porción transducida de las copas oculares después se introdujo en gelatina al 12 %, se infundió con sacarosa 2,3 M y se congeló en nitrógeno líquido. Se cortaron criosecciones (50 nm) empleando un Leica Ultramicrotome EM FC7 (Leica Microsystems) y se puso mucho cuidado para alinear longitudinalmente los cilios que conectan los PR. Las mediciones del espesor del RPE y los recuentos de los gránulos de lipofuscina en los ojos de *Abca4*<sup>-/-</sup> fueron realizadas por un operario con mascarilla (Roman Polishchuk) utilizando el programa informático iTEM (Olympus SYS, Hamburgo, Alemania). Brevemente, se midió el espesor de RPE en al menos 30 áreas diferentes a lo largo de la longitud del espécimen utilizando la herramienta "Arbitrary Line" del programa iTEM. Se empleó el módulo "Touch count" del programa iTEM para contar el número de gránulos de lipofuscina en las áreas de 25  $\mu\text{m}^2$  distribuidas aleatoriamente a través de la capa de RPE. La densidad de los gránulos se expresó como el número de gránulos por 25  $\mu\text{m}^2$ . Se realizó el inmunoanálisis de oro dirigido a ensayar la expresión de ABCA4-HA en muestras de *Abca4*<sup>-/-</sup> después de la administración del vector de AAV, incubando criosecciones sucesivamente con el anticuerpo monoclonal anti-HA (MMS-101P-50, Covance, 1:50), IgG antirratón de conejo, y proteína A conjugada con partículas de oro de 10 nm. Para cuantificar la localización de la rodopsina en los cilios conectores de PR de *sh1*, se incubaron sucesivamente criosecciones de ratones *sh1* con anticuerpo anti-rodopsina (1D4, ab5417, Abcam, Cambridge, Reino Unido, 1:100), IgG antirratón de conejo, y proteína A conjugada con partículas de oro de 10 nm. La cuantificación de la densidad de oro de rodopsina en los cilios conectores fue realizada por un operario con mascarilla empleando el programa iTEM (Olympus SYS). Brevemente, se empleó el módulo "Touch count" del programa iTEM para contar el número de partículas de oro por cilio, que fue normalizado al perímetro del cilio (nm) que fue medido utilizando la herramienta "Closed polygon tool". La densidad del oro se expresó como partículas de oro/nm. Las criosecciones inmunomarcadas con oro se analizaron con un microscopio electrónico FEI Tecnai-12 (FEI, Eindhoven, Países Bajos) equipado con una cámara Veletta CCD para la adquisición de imágenes digitales.

#### *Análisis electrofisiológicos*

Para evaluar la recuperación de la desensibilización a la luz, los ojos se estimularon con 3 destellos de luz de 1 cd s/m<sup>2</sup> y después se desensibilizaron mediante una exposición a luz constante (300 cd/m<sup>2</sup>) durante 3 minutos. Después los ojos se estimularon a lo largo del tiempo empleando el destello de pre-desensibilización (1 cd s/m<sup>2</sup>) a los 0, 5, 15, 30, 45 y 60 minutos después de la desensibilización. Se evaluó la recuperación de la actividad de los bastones calculando la proporción entre la onda b generada después de la desensibilización (en diferentes momentos) y la generada antes de la desensibilización. La recuperación de la desensibilización a la luz se evaluó en ratones de 2 meses de edad *Abca4*<sup>-/-</sup> a las 6 semanas después del tratamiento (figura 13).

#### *Análisis estadístico*

Los datos se presentan como promedio  $\pm$  error estándar del promedio (e.e.p.). Unos valores de p estadísticos  $<0,05$  se consideraron significativos. Se empleó un ANOVA de una vía con el procedimiento de comparación múltiple post-hoc para comparar los datos mostrados en la figura 2 (p de ANOVA: A. 0,0002; B. 0,0015; C.  $2 \times 10^{-7}$ ), la figura 8B (p de ANOVA: 0,076) y la figura 11B (p de ANOVA: 0,5). Se contaron los gránulos de lipofuscina (figura 7B) y los melanosomas (figura 10B), los recuentos se analizaron mediante la desviación de un modelo lineal generalizado binomial negativo (61) (figura 7B: valor de p del análisis de la desviación 0,03794; figura 10B: valor de p del análisis de la desviación  $<< 2 \times 10^{-10}$ ). Las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos determinadas con el procedimiento de comparación múltiple post-hoc se marcan con asteriscos en las figuras.

Resultados:

*Generación de vectores de AAV de tamaño normal, sobredimensionados y duales*

Los inventores generaron vectores sobredimensionados (OZ), de transruptura (TS) e híbridos de AAV duales que incluían las secuencias codificadoras del indicador de EGFP, de ABCA4-3xflag terapéutico o de MYO7A-HA. Los inventores también generaron vectores de transruptura (TS) e híbridos de AAV duales que incluían el CEP290 terapéutico marcado en su C-terminal con el marcador HA. Las secuencias recombinogénicas incluidas en los vectores híbridos de AAV duales se basan en una región previamente descrita del transgén de la fosfatasa alcalina (AP, AP híbrida de AAV duales) (39) o una secuencia de 77 pb procedente del genoma del fago F1 (AK, AK híbrida de AAV duales) que los inventores descubrieron que era recombinogénica en experimentos previos (Colella y Auricchio, datos no publicados). Los inventores también generaron vectores de solapamiento de AAV duales (OV) para ABCA4, MYO7A y CEP290. Los inventores no generaron vectores de AAV OV duales para el EGFP porque la eficacia de esta estrategia se basa en solapamientos específicos de transgén para la reconstitución (38) y, por tanto, no pueden extrapolarse de un gen a otro. En lugar de esto, para el EGFP los inventores generaron vectores de AAV individuales de tamaño normal ("normal size", NS) para comparar los niveles de la expresión del transgén de las diversas estrategias. Las construcciones generadas para la producción de todos los vectores de AAV empleados en este estudio se listan en la tabla 1, y en la figura 1 se muestra una representación esquemática de las diversas estrategias.

Los inventores emplearon los vectores AAV2/2 para los experimentos *in vitro*, con los promotores de citomegalovirus ubicuo (CMV) o de beta-actina de pollo (CBA), que transducen con eficacia las células HEK293 (40). Además, puesto que el uso de ITR heterólogas procedentes de los serotipos 2 y 5 de AAV pueden aumentar el reensamblaje productivo de los vectores de AAV duales (51), los inventores también generaron vectores de AK de AAV duales con ITR heterólogas (figura 17a) que codifican ABCA4 y MYO7A. Los vectores de AAV con ITR heterólogas se encapsularon en cápsidas de AAV del serotipo 2 y se ensayaron *in vitro*.

En los experimentos realizados *in vivo* en la retina, los inventores emplearon vectores AAV2/8, que transducen con eficacia el RPE y los PR (10-12), pero apenas infectan a las células HEK293, y los promotores de CBA y CMV ubicuos (11), o los promotores de la distrofia macular viteliforme de tipo 2 específico de RPE (VMD2) (41) o de rodopsina específico de PR (RHO) y de rodopsina quinasa (RHOK) (10) (tabla 1).

*Los vectores de AAV duales permiten conseguir unos altos niveles de transducción in vitro.*

Los inventores inicialmente compararon la eficacia de las diversas estrategias con OZ, OV, TS y AP y AK híbridas de AAV duales para la transducción de genes grandes mediada por AAV *in vitro* infectando células HEK293 con los vectores AAV2/2 [multiplicidad de infección ("multiplicity of infection"), m.o.i.:  $10^5$  copias del genoma (GC)/célula de cada vector] con promotores ubicuos (CMV para EGFP, ABCA4-3xflag, y CEP290-HA, y CBA para MYO7A-HA).

Los lisados celulares se analizaron mediante transferencia Western con anticuerpos anti-EGFP (figura 2A), anti-3xflag (para detectar ABCA4-3xflag, figura 2B), anti-MYO7A (figura 2C) y anti-HA (para detectar CEP290-HA) (figura 12A). Se muestran transferencias Western representativas en las figuras 2A-C y 12A. Todas las estrategias produjeron la expresión de proteínas con el tamaño esperado. Tal como se había predicho, no se observaron bandas con el tamaño esperado cuando se emplea solo uno de los vectores de AAV duales para la infección (figura 2A-C y 12A). La cuantificación de la expresión del transgén (figura 2D-F) demuestra que la estrategia de la AP híbrida de AAV duales produjo los niveles más bajos de expresión del transgén, mientras que las estrategias de OV, TS y AK híbrida de AAV duales fueron más eficaces que la estrategia de AAV OZ. Las estrategias de TS y de AK híbrida de AAV duales confirman su capacidad para expresar con eficacia genes grandes también en el caso del CEP290 (figura 12B). Además, el uso de vectores de AK de AAV duales con ITR heterólogas produjo la expresión de las proteínas ABCA4 y MYO7A de longitud completa *in vitro* (figura 17).

*Los vectores de TS y de AK híbrida de AAV duales, pero no los vectores de OV, transducen los fotorreceptores de ratón y de cerdo.*

Después, los inventores evaluaron cada uno de los sistemas basados en AAV para la transducción de genes grandes en la retina de ratón. Para evaluar el AAV OV dual, que es específico de transgén, los inventores utilizaron los genes terapéuticos ABCA4 y MYO7A (figura 3). Los inventores emplearon EGFP para evaluar las estrategias de AAV OZ y de TS, AP y AK híbridas de AAV duales (figura 4). Un análisis de la transferencia Western de lisados retinianos, un mes después de la administración subretiniana en ratones C57BL/6 de los vectores de AAV OV duales (dosis de cada vector/ojo:  $1,3 \times 10^9$  GC), que codifican ABCA4-3xflag con el promotor de CMV ubicuo, reveló una robusta expresión de proteínas (figura 3A). Para determinar cuál es el tipo celular en la retina que expresa ABCA4, los inventores emplearon vectores de AAV OV duales que contenían los promotores de RHO y RHOK específicos de PR, o VMD2 específico de RPE (dosis de cada vector/ojo:  $1 \times 10^9$  GC). Los inventores detectaron la expresión de la proteína ABCA4 en retinas inyectada con VMD2, pero no en las que contenían los promotores de RHO y RHOK (figura 3A). Estos resultados también fueron confirmados en las retinas de cerdos Large White. La retina de cerdo es un excelente modelo para evaluar la eficacia de un vector debido a su tamaño, que es similar a la retina humana, y porque está enriquecida con conos que se concentran en una región similar a una banda, cuya densidad de conos



es comparable a la de la mácula de primates (11). Los inventores inyectaron subretinariamente a cerdos Large White los vectores de AAV OV duales que codifican ABCA4-3xflag (dosis de cada vector/ojo:  $1 \times 10^{10}$  GC), y observaron la expresión de la proteína ABCA4 con el promotor de CMV pero no con el promotor de RHO (figura 3B). De modo similar, la administración subretiniana de los vectores de AAV OV duales que codifican MYO7A-HA produjo una débil expresión de la proteína MYO7A en la retina de ratón con el promotor de CBA ubicuo (dosis de cada vector/ojo:  $2,5 \times 10^9$  GC) y no se detectó expresión con el promotor de RHO (dosis de cada vector/ojo:  $3,2 \times 10^9$  GC) (figura 3C). Globalmente, estos datos sugieren que la estrategia de AAV OV duales es más eficaz para la transferencia de genes grandes a RPE que a PR, que son la diana principal de la terapia génica para IRD, tales como STGD y USH1B.

Para descubrir una estrategia basada en AAV que transduzca con eficacia genes grandes a PR, los inventores evaluaron las propiedades de transducción retinianas de las estrategias de AAV OZ y de TS, AP y AK híbridas de AAV duales. Los inventores inicialmente emplearon EGFP, que permite localizar con facilidad la expresión de transgenes en los diversos tipos de células retinianas, incluyendo PR, así como para comparar de modo adecuado los niveles de transducción de transgenes grandes basada en AAV con los de un vector de AAV único de tamaño normal (NS). Se inyectaron subretinariamente ratones C57BL/6 con los vectores de AAV NS, y OZ y TS, y AP y AK híbridas de AAV duales (dosis de cada vector/ojo:  $1,7 \times 10^9$  GC), que codifican EGFP bajo el control transcripcional del promotor de CMV. Un mes después, las fotografías del fondo del ojo demostraron que se obtuvieron los niveles más altos de fluorescencia con las estrategias de AAV NS, y TS y AK híbrida de AAV duales (figura 15). El análisis con microscopio de fluorescencia de criosecciones retinianas demostró que pueden observarse niveles detectables de transducción de RPE o PR en 77 % (10/13) de las retinas inyectadas con los vectores de AAV NS y OZ, y 92 % (12/13) de las retinas inyectadas con los vectores de TS y AP y AK híbridas de AAV duales. La figura 4 muestra las retinas mejor transducidas para cada uno de estos grupos. Los niveles más robustos de transducción de PR se obtuvieron con las estrategias de AAV NS y TS y AK híbrida de AAV duales.

Los inventores después evaluaron los niveles de transducción específica de PR en ratones C57BL/6 tras la administración subretiniana de vectores de TS y de AK híbrida de AAV duales, que parecen ser los más prometedores para la reconstitución de genes grandes en PR, así como de vectores de AAV NS como comparación (dosis de cada vector/ojo:  $2,4 \times 10^9$  GC). Todos los vectores codifican EGFP bajo el control transcripcional del promotor de RHO específico de PR. Un mes después de la administración, las retinas se criocortaron y se analizaron con un microscopio de fluorescencia (figura 5A). Todas las estrategias produjeron niveles altos de transducción de PR, que parecen ser más constantes con el vector de AAV NS individual. Los inventores descubrieron transducción de PR en 100 % (6/6) de las retinas inyectadas con AAV NS, 60 % (9/15) de las retinas inyectadas con TS de AAV dual, y 71 % (10/14) de las retinas inyectadas con AK híbrida de AAV dual. La figura 5A muestra las retinas mejor transducidas para cada uno de estos grupos. Así, los inventores concluyeron que las estrategias de TS y de AK híbrida de AAV duales permiten conseguir una transducción eficaz de PR de ratón, aunque a niveles que son menores que los obtenidos con un AAV NS. Los inventores después confirmaron que la administración subretiniana de los vectores de TS y de AK híbrida de AAV duales (dosis de cada vector/ojo:  $1 \times 10^{11}$  GC; retinas positivas a EGFP del total de inyectadas: 2/2 TS de AAV dual; 2/2 AK híbrida de AAV dual) transdujeron los PR de cerdos White Large (figura 5B).

Además, la administración subretiniana a la retina de cerdo de los vectores de TS y de AK híbrida de AAV duales (dosis de cada vector/ojo:  $1 \times 10^{11}$ ) produjo una expresión eficaz de ABCA4-3xflag de longitud completa específicamente en PR (figura 16a) y MYO7A-HA de longitud completa en RPE y PR (figura 16b). De modo interesante, los vectores de AK híbrida de AAV dual produjeron una expresión más constante de proteínas ABCA4 y MYO7A grandes en los PR, comparado con los vectores de TS de AAV duales (figura 16).

#### *Los vectores de AAV duales mejoran el fenotipo retiniano de modelos de ratón de STGD y USH1B*

Para comprender si los niveles de transducción de PR obtenidos con las estrategias de TS y de AK híbrida de AAV duales pueden ser terapéuticamente importantes, los inventores los investigaron en la retina de dos modelos de ratón de IRD, STGD y USH1B, provocadas por mutaciones en los genes grandes ABCA4 y MYO7A, respectivamente.

Aunque el modelo de ratón *Abca4*<sup>-/-</sup> no sufre una degeneración de PR grave (42), la ausencia del transportador retiniano todo-trans codificado por ABCA4 en los segmentos exteriores de los PR (43-44) provoca una acumulación de lipofuscina en los PR, así como en el RPE, como resultado de la fagocitosis de PR por el RPE (45). Como consecuencia, tanto el número de gránulos de lipofuscina en el RPE como el espesor de las células del RPE son mayores en ratones *Abca4*<sup>-/-</sup> que en ratones control (45). Además, el modelo de ratón *Abca4*<sup>-/-</sup> se caracteriza por una adaptación retrasada a la oscuridad (57, 62). Puesto que ABCA4 se expresa específicamente en los PR, los inventores generaron vectores de TS y de AK híbrida de AAV duales que codifican ABCA4-3xflag bajo el control transcripcional del promotor de RHO. Estos vectores se inyectaron subretinariamente en ratones C57BL/6 de tipo salvaje (dosis de cada vector/ojo:  $3-5 \times 10^9$  GC) y un mes después las retinas se lisaron y se analizaron mediante una transferencia Western con anticuerpos anti-3xflag. Ambas estrategias produjeron niveles robustos, pero variables de expresión de ABCA4-3xflag. Los niveles de expresión de ABCA4-3xflag fueron más constantes en retinas tratadas con los vectores de AK híbrida de AAV dual (figura 6A). Estos resultados fueron confirmados en cerdos Large White (los datos no se muestran). Además, ratones de un mes de edad albinos *Abca4*<sup>-/-</sup> fueron inyectados

subretinariamente con los vectores de AK híbrida de AAV dual RHO-ABCA4-HA (dosis de cada vector/ojo:  $1\text{-}3 \times 10^9$  GC). Tres meses después se recolectaron los ojos y un análisis con microscopía inmunoelectrónica con anticuerpos anti-hemaglutinina (HA) de secciones retinianas confirmó que las inmunopartículas de oro estaban correctamente localizadas en los segmentos exteriores de los PR solo en los animales que fueron inyectados con la combinación de vectores de AK híbrida de AAV dual 5' y 3' (figura 6B). Para evaluar la funcionalidad de la proteína ABCA4 expresada por los vectores duales, los inventores también realizaron una microscopía de transmisión de electrones para evaluar la presencia y el número de gránulos de lipofuscina en el RPE (figura 7) y el espesor del RPE (figura 8). Ambos fueron mayores en las retinas de los ratones *Abca4*<sup>-/-</sup> inyectados con los vectores control que en las retinas de controles de Balb/C de la misma edad de tipo salvaje, y se redujeron o normalizaron en los ojos inyectados con los vectores terapéuticos de TS o AK híbrida de AAV duales (figura 7B y 8B). Además, la capacidad de los fotorreceptores de *Abca4*<sup>-/-</sup> para recuperarse de la desensibilización a la luz mejoró significativamente en las retinas tratadas con los vectores terapéuticos cuando se comparan con las retinas control (figura 13).

Los inventores después ensayaron los niveles de transducción en PR y la eficacia de la transferencia del gen *MYO7A* mediada por AAV duales en la retina de ratones *sh1*, el modelo de USH1B que se emplea con más frecuencia (23-24, 46-48). En ratones *sh1*, una deficiencia en la *Myo7a* motora provoca la localización incorrecta de los melanosomas del RPE (47), que no se introducen en las microvellosidades del RPE, y la acumulación de rodopsina en los cilios conectores de los PR (48). Puesto que *MYO7A* se expresa en RPE y PR (22-23), los inventores emplearon los vectores de TS y de AK híbrida de AAV duales que expresan *MYO7A*-HA bajo el control transcripcional del promotor de CBA ubicuo. Se inyectaron ratones de un mes de edad de tipo salvaje C57BL/6 con los vectores de AAV duales (dosis de cada vector/ojo:  $1,7 \times 10^9$  GC) y se evaluaron los lisados de la copa ocular un mes después empleando un análisis de la transferencia Western con anticuerpos anti-HA. Los resultados muestran unos niveles similares constantes y robustos de expresión de *MYO7A* en las retinas tratadas con ambas estrategias (figura 9). Aprovechando la capacidad del anticuerpo anti-*MYO7A* de los inventores para reconocer la *MYO7A* murina y humana, se compararon los niveles de *MYO7A* logrados tras la administración de los vectores de AAV duales a ojos de *sh1*<sup>-/-</sup> con los expresados endógenamente en los ojos de *sh1*<sup>+/+</sup> (figura 14). Se emplearon los promotores de CBA (figura 14, panel izquierdo, dosis de cada vector/ojo:  $1\text{-}6 \times 10^9$  GC) y de RHO (figura 14, panel derecho, dosis de cada vector/ojo:  $2 \times 10^9$  GC) para distinguir la expresión de *MYO7A* lograda en PR y RPE de la de PR por sí solos: la primera es de aproximadamente 20 % (figura 14, panel izquierdo) y la última de aproximadamente 50 % de *Myo7a* endógena (figura 14, panel derecho). El análisis muestra además que los niveles de expresión de *MYO7A* logrados en PR por los vectores de AK híbrida de AAV dual son mayores que los obtenidos con los vectores de TS de AAV dual, a pesar de que el número de retinas transducidas es similar (TS-*MYO7A*: 3 retinas positivas de 8 inyectadas; AK-*MYO7A*: 4 retinas positivas de 8 tratadas; figura 14, panel derecho).

Para ensayar la capacidad de *MYO7A* expresada a partir de los vectores de AAV duales para rescatar los defectos de las retinas de *sh1*<sup>-/-</sup>, los inventores después inyectaron subretinariamente los conjuntos de CBA de los vectores de TS y de AK híbrida de AAV duales (dosis de cada vector/ojo:  $2,5 \times 10^9$  GC) en ratones *sh1* de un mes de edad. Los inventores evaluaron la localización de melanosomas en el RPE (figura 10) y de rodopsina (figura 11) mediante el análisis de una sección retiniana semidelgada y mediante microscopía inmunoelectrónica, respectivamente. A diferencia de los melanosomas de *sh1*<sup>+/-</sup>, que no se ven afectados, los melanosomas de *sh1*<sup>-/-</sup> no se introducen en las microvellosidades del RPE después de la administración de los vectores control (cada mitad 5' individual de las estrategias de AAV duales, figura 10). El número de melanosomas del RPE localizados correctamente en posición apical mejoró significativamente después de la administración de los vectores de TS o de AK híbrida de AAV duales que codifican *MYO7A* (figura 10B). De modo notable, los inventores también descubrieron que la expresión de *MYO7A* mediada por los vectores de TS y de AK híbrida de AAV duales reduce la acumulación de rodopsina en los cilios conectores de PR de *sh1*<sup>-/-</sup> (figura 11).

#### 45 Análisis:

Aunque la terapia génica mediada por AAV es eficaz en modelos animales y en pacientes con trastornos de ceguera heredados (5-9, 49), su aplicación a enfermedades que afectan a la retina y que requieren la transferencia de genes mayores que 5 kb (denominados genes grandes) es inhibida por la capacidad de carga limitada de AAV. Para solucionar este problema, los inventores compararon la eficacia de diversas estrategias basadas en AAV para la transducción de genes grandes, que incluyen las estrategias de AAV OZ y OV, TS e híbridos de AAV duales *in vitro* y en la retina de ratón y de cerdo. En experimentos previos, los inventores seleccionaron una secuencia de 77 pb procedente del genoma del fago F1 que fue identificada por los inventores debido a sus propiedades recombinogénicas y se usó en la estrategia de híbrido dual (AK, AK híbrida de AAV dual).

Los resultados *in vitro* e *in vivo* de los inventores demostraron que el vector de AK híbrida de AAV dual, de modo sorprendente, tuvo una actuación mejor que el vector de AP híbrida de AAV dual, y que todas las estrategias de AAV dual que ensayaron los inventores (con la excepción de AP híbrida de AAV dual) tuvieron una actuación mejor que los vectores de AAV OZ en términos de niveles de transducción. Esto puede explicarse por el tamaño homogéneo de la población del genoma de AAV dual cuando se compara con los genomas de OZ, lo cual puede favorecer la generación de módulos de expresión de transgenes grandes transcripcionalmente activos.

60 La estrategia de AAV OV dual parece particularmente interesante cuando se compara con las estrategias de TS o AK híbrida, puesto que los vectores de AAV OV duales solo contienen secuencias que pertenecen al módulo de

expresión del transgén terapéutico. Sin embargo, cuando los inventores administraron los vectores de AAV OV duales al espacio subretiniano de ratones y cerdos adultos, solo fueron capaces de detectar la expresión de la proteína ABCA4 grande cuando se emplean los promotores ubicuos específicos de RPE, pero no los promotores específicos de PR. Esto puede sugerir que la recombinación homóloga necesaria para la reconstitución de AAV OV duales es más eficaz en el RPE que en los PR. Esto resulta coherente con los niveles bajos de recombinación homóloga indicados en neuronas postmitóticas (50) y podría explicar, al menos en parte, la falta de transducción de MYO7A mediada por AAV OV duales indicada en fechas recientes por otros grupos (30). Los inventores concluyeron que la administración subretiniana de los vectores de AAV OV duales no debe usarse para la transferencia de genes grandes a los PR, aunque los inventores no pueden excluir que unas secuencias que sean más recombinogénicas que las incluidas en los vectores de ABCA4 y MYO7A de AAV duales de los inventores puedan permitir una recombinación homóloga eficaz en los PR.

Las estrategias de TS y de AK híbrida de AAV duales transducen con eficacia los PR de ratón y de cerdo, de manera diferente a lo observado por los inventores con los AAV OV duales. Esto resulta coherente con la conocimiento de que el mecanismo de reconstitución de genes grandes mediado por las estrategias de TS y de AK híbrida de AAV duales puede realizarse a través de la reunificación de cabeza a cola mediada por ITR (32, 35, 51), en lugar de a través de una recombinación homóloga.

Los niveles de transducción de PR de ratón logrados por los inventores con TS y AK híbrida de AAV duales son menores y menos constantes que con los vectores NS individuales. Sin embargo, el AAV dual puede ser eficaz para tratar trastornos de ceguera heredados que requieran unos niveles relativamente bajos de expresión transgénica, es decir, enfermedades heredadas como autosómicas recesivas. En efecto, los inventores han demostrado que la administración subretiniana de TS y AK híbrida de AAV duales mejora e incluso normaliza los defectos retinianos de dos modelos animales de enfermedades retinianas heredadas, STGD y USH1B, que son debidas a mutaciones en genes grandes y son dianas atractivas para la terapia génica.

El tamaño del genoma de los vectores de AAV duales es homogéneo, lo cual significa que los problemas de identidad y seguridad relacionados con su uso serán menos considerables que los relacionados con los vectores de AAV OZ, que presentan unos tamaños de genomas heterogéneos. Por contraste, los inventores no detectaron anomalías histológicas retinianas ni de ERG en los ratones que fueron seguidos hasta 1-2 meses después de la administración del vector de AAV dual (los datos no se muestran).

En conclusión, los inventores han identificado una nueva secuencia recombinogénica (AK) que aumenta de modo notable la actuación del sistema de vector híbrido de AAV dual. De hecho han descubierto que los vectores de AAV duales son eficaces *in vitro* y en la retina *in vivo*. Aunque los vectores de AAV OV duales transducen con eficacia el RPE, no transducen los PR, mientras que las estrategias de TS y de AK híbrida de AAV duales dirigen con eficacia la reconstitución de genes grandes en ambos tipos de células. La administración de las estrategias de TS y de AK híbrida de AAV duales mejora el fenotipo retiniano de modelos de ratón de STGD y USH1B, proporcionando pruebas de la eficacia de estas estrategias para la terapia génica para estos y otros trastornos de ceguera que requieren la transferencia de genes grandes a los PR retinianos, así como al RPE. Estos descubrimientos ampliarán mucho la aplicación de los vectores de AAV para terapias génicas no solo a los ojos, sino también al músculo y a otros órganos y tejidos. Las enfermedades distintas a las IRD provocadas por genes defectuosos mayores que 5 kb incluyen, como ejemplos no limitantes, las distrofias musculares, las deficiencias en disferlina (distrofia muscular de cinturas de tipo 2B y miopatía de Miyoshi), la fibrosis quística, la hemofilia.

#### Referencias bibliográficas

1. M. M. Sohocki, *et al.*, Hum. Mutat., 17, 42-51 (2001).
2. T. Dryja, en The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases, C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, D. Valle, eds. (McGraw-Hill, Nueva York, NY, 2001), vol. 4, pp. 5903-5933.
3. P. Colella, *et al.*, Trends Mol. Med., 15, 23-31 (2009).
4. L. H. Vandenberghe, A. Auricchio, Gene Ther., 19, 162-168 (2012).
5. J. W. Bainbridge, *et al.*, N. Engl. J. Med., 358, 2231-2239 (2008).
6. A. V. Cideciyan, *et al.*, N. Engl. J. Med., 361, 725-727 (2009).
7. A. M. Maguire, *et al.*, N. Engl. J. Med., 358, 2240-2248 (2008).
8. A. M. Maguire, *et al.*, Lancet, 374, 1597-1605 (2009).
9. F. Simonelli, *et al.*, Mol. Ther., 18, 643-650 (2010).
10. M. Allocca, *et al.*, J. Virol., 81, 11372-11380 (2007).
11. C. Mussolino, *et al.*, Gene Ther., 18, 637-645 (2011).

12. L. H. Vandenberghe, *et al.*, *Sci., Transl. Med.*, 3, 88ra54 (2011).
13. A. Auricchio, *Hum., Gene Ther.*, 22, 1169-1170 (2011).
14. M. Natkunarajah, *et al.*, *Gene Ther.*, 15, 463-467 (2008).
15. B. Dong, *et al.*, *Mol. Ther.*, 18, 87-92 (2010).
- 5 16. Y. Lai, *et al.*, *Mol. Ther.*, 18, 75-79 (2010).
17. Z. Wu, *et al.*, *Mol. Ther.*, 18, 80-86 (2010).
18. Y. Wang, *et al.*, *Hum. Gene Ther. Methods*, 23, 225-233 (2012).
19. P. L. Hermonat, *et al.*, *FEBS Lett.*, 407, 78-84 (1997).
20. R. Allikmets, *Nat. Genet.*, 17, 122 (1997).
- 10 21. J. M. Millan, *et al.*, *J. Ophthalmol.*, 2011, 417217 (2011).
22. T. Hasson, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92, 9815-9819 (1995).
23. X. Liu, *et al.*, *Cell. Motil. Cytoskeleton*, 37, 240-252 (1997).
24. D. Gibbs, *et al.*, *Invest., Ophthalmol. Vis. Sci.*, 51, 1130-1135 (2010).
25. J. C. Grieger, *et al.*, *J. Virol.*, 79, 9933-9944 (2005).
- 15 26. J. Wu, *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 18, 171-182 (2007).
27. M. Allocca, *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 118, 1955-1964 (2008).
28. P. E. Monahan, *et al.*, *Mol. Ther.*, 18, 1907-1916 (2010).
29. W. E. Grose, *et al.*, *PLoS One*, 7, e39233 (2012).
30. V. S. Lopes, *et al.*, *Gene Ther.* (2013).
- 20 31. M. L. Hirsch, *et al.*, *Mol. Ther.*, 18, 6-8 (2010).
32. D. Duan, *et al.*, *J. Virol.*, 72, 8568-8577 (1998).
33. Z. Yan, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 6716-6721 (2000).
34. D. Duan, *et al.*, *Mol. Ther.*, 4, 383-391 (2001).
35. A. Ghosh, *et al.*, *Mol. Ther.*, 16, 124-130 (2008).
- 25 36. Y. Lai, *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 23, 1435-1439 (2005).
37. S. J. Reich, *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 14, 37-44 (2003).
38. A. Ghosh, *et al.*, *J. Gene Med.*, 8, 298-305 (2006).
39. A. Ghosh, *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 22, 77-83 (2011).
40. X. Dong, *et al.*, *PLoS One*, 5, e13479 (2010).
- 30 41. N. Esumi, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 279, 19064-19073 (2004).
42. L. Wu, *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 664, 533-539 (2010).
43. M. Illing, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272, 10303-10310 (1997).
44. H. Sun, *et al.*, *Nat. Genet.*, 17, 15-16 (1997).
45. N. L. Mata, *et al.*, *Invest., Ophthalmol. Vis. Sci.*, 42, 1685-1690 (2001).
- 35 46. C. Lillo, *et al.*, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 533, 143-150 (2003).
47. X. Liu, *et al.*, *Nat. Genet.*, 19, 117-118 (1998).
48. X. Liu, *et al.*, *J. Neurosci.*, 19, 6267-6274 (1999).

49. S. G. Jacobson, *et al.*, *Mol. Ther.*, 13, 1074-1084 (2006).
50. M. L. Fishel, *et al.*, *Mutat., Res.*, 614, 24-36 (2007).
51. Z. Yan, *et al.*, *J. Virol.*, 79, 364-379 (2005).
52. G. Gao, *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 11, 2079-2091 (2000).
- 5 53. A. Auricchio, *et al.*, *Hum. Gene Ther.*, 12, 71-76 (2001).
54. C. Mueller, *et al.*, *Curr. Protoc. Microbiol.*, capítulo 14, unidad 14D 11 (2012).
55. L. Drittanti, *et al.*, *Gene Ther.*, 7, 924-929 (2000).
56. Y. Zhang, *et al.*, *J. Virol.*, 74, 8003-8010 (2000).
57. R. A. Radu, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 5928-5933 (2004).
- 10 58. V. E. Papaioannou, J. G. Fox, *Lab. Anim. Sci.*, 43, 189-192 (1993).
59. F. Q. Liang, *et al.*, en *Methods in Molecular Medicine: Vision Research Protocols*, P.E. Rakoczy, ed. (Humana Press Inc, Totowa, NJ., 2000), vol. 47, pp. 125-139.
60. A. Gargiulo, *et al.*, *Mol. Ther.*, 17, 1347-1354 (2009).
61. V. N. Venables, B. D. Ripley, *Modern Applied Statistics with S*, S. J. Chambers, W. Eddy, W. Hardle, Sheater S, L. Tierney, eds. (Springer Science+Business Media, Nueva York, EE. UU., 2002) [cuarta edición].
- 15 62. Weng, J., *et al.*, *J Cell*, 98, 13-23 (1999).

**Listado de secuencias**

- 20 <110> FONDAZIONE TELETHON
- <120> Suministro eficaz de genes grandes por vectores de AAV duales
- <130> documento PCT 122889
- 25 <150> documento US61/813.342
- <151> 18-04-2013
- <160> 31
- 30 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 82
- <212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> sintético
- 40 <400> 1
- gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga 60
- cagagaagac tcttgcgttt ct 82
- <210> 2
- 45 <211> 51
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 50 <223> sintético
- <400> 2

ES 2 704 677 T3

gataggcacc tattggtctt actgacatcc actttgcctt tctctccaca g 51

<210> 3  
<211> 77  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> sintético

<400> 3  
gggattttgc cgatttcggc ctattggtta aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac 60  
gcgaatttta acaaaat 77

15 <210> 4  
<211> 130  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> sintético

<400> 4  
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgacctt 60  
ggtcgccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gaggggccaa ctccatcact 120  
25 aggggttctt 130

<210> 5  
<211> 175  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> sintético

35 <400> 5  
ctctcccc tgtcgcgttc gctcgctcgc tggctcgttt gggggggtgg cagctcaaag 60  
agctgccaga cgacggccct ctggccgtcg ccccccaaa cgagccagcg agcgagcgaa 120  
cgcgacaggg gggagagtgc cacactctca agcaaggggg ttttgaagc agtga 175

<210> 6  
40 <211> 153  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
45 <223> sintético

<400> 6  
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60  
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120  
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gac 153

50 <210> 7  
<211> 583  
<212> ADN

ES 2 704 677 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> sintético

5 <400> 7

tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtccgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta	300
catgacctta cgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cggttttggc agtacaccaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgtata ataaccccgcc cccgttgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgt	583

10 <210> 8  
<211> 133  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> sintético

<400> 8

20

gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga	60
cagagaagac tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactttgcc	120
tttctctcca cag	133

25 <210> 9  
<211> 2918  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> sintético

30 <400> 9

ES 2 704 677 T3

atgggcttcg tgagacagat acagcttttg ctctggaaga actggaccct gcggaaaagg	60
caaaagattc gctttgtggt ggaactcgtg tggcctttat ctttatttct ggtcttgatc	120
tggttaagga atgccaaccc gctctacagc catcatgaat gccatttccc caacaaggcg	180
atgccctcag caggaatgct gccgtggctc caggggatct tctgcaatgt gaacaatccc	240
tgttttcaa gccccacccc aggagaatct cctggaattg tgtcaaacta taacaactcc	300
atcttgga ggttatatcg agattttcaa gaactcctca tgaatgcacc agagagccag	360
caccttgcc gtatttgga agagctacac atcttgccc aattcatgga caccctccgg	420
actcacccgg agagaattgc aggaagagga attcgaataa gggatatctt gaaagatgaa	480
gaaacactga cactatttct cattaanaac atcggcctgt ctgactcagt ggtctacctt	540
ctgatcaact ctcaagtccg tccagagcag ttcgctcatg gagtcccga cctggcgctg	600
aaggacatcg cctgcagcga ggcctcctg gagcgcttca tcatcttcag ccagagacgc	660
ggggcaaaga cggcgcgcta tgcctgtgc tccctctccc agggcacct acagtggata	720
gaagacactc tgtatgcaa cgtggacttc ttcaagctct tccgtgtgct tcccacactc	780
ctagacagcc gttctcaagg tatcaatctg agatcttggg gaggaatatt atctgatatg	840
tcaccaagaa ttcaagagtt tatccatcgg ccgagtatgc aggacttgct gtgggtgacc	900
aggcccctca tgcagaatgg tggccagag acctttacaa agctgatggg catcctgtct	960



ES 2 704 677 T3

gacctcctgt gtggctaccc cgagggaggt ggctctcggg tgctctcctt caactggtat 1020  
gaagacaata actataaggc ctttctgggg attgactcca caaggaagga tcctatctat 1080  
tcttatgaca gaagaacaac atccttttgt aatgcattga tccagagcct ggagtcaaat 1140  
cctttaacca aaatcgcttg gagggcggca aagcctttgc tgatgggaaa aatcctgtac 1200  
actcctgatt cacctgcagc acgaaggata ctgaagaatg ccaactcaac ttttgaagaa 1260  
ctggaacacg ttaggaagtt ggtcaaagcc tgggaagaag tagggcccca gatctggtac 1320  
ttctttgaca acagcacaca gatgaacatg atcagagata ccctggggaa cccaacagta 1380  
aaagactttt tgaatagga gcttggtgaa gaaggtatta ctgctgaagc catcctaaac 1440  
ttcctctaca agggccctcg ggaaagccag gctgacgaca tggccaactt cgactggagg 1500  
gacatattta acatcactga tcgcaccctc cgccttgtca atcaatacct ggagtgcttg 1560  
gtcctggata agtttgaaag ctacaatgat gaaactcagc tcaccaacg tgcctctct 1620  
ctactggagg aaaacatggt ctgggccgga gtggatttcc ctgacatgta tcctggacc 1680  
agctctctac caccacacgt gaagtataag atccgaatgg acatagacgt ggtggagaaa 1740  
accaataaga ttaaagacag gtattgggat tctggcccca gagctgatcc cgtggaagat 1800  
ttccggtaca tctggggcgg gtttgcctat ctgcaggaca tggttgaaca ggggatcaca 1860  
aggagccagg tgcaggcggg ggctccagtt ggaatctacc tccagcagat gccctacccc 1920  
tgcttctggt acgattcttt catgatcctc ctgaaccgct gtttccctat cttcatggtg 1980  
ctggcatgga tctactctgt ctccatgact gtgaagagca tcgtcttgga gaaggagttg 2040  
cgactgaagg agacctgaa aaatcagggt gtctccaatg cagtgatttg gtgtacctgg 2100  
ttcctggaca gcttctccat catgtogatg agcatcttcc tcctgacgat attcatcatg 2160  
catggaagaa tcctacatta cagcgacca ttcatctct tctgttctt gttggtttc 2220  
tccactgcca ccatcatgct gtgctttctg ctgagcact tcttctcaa ggccagtctg 2280  
gcagcagcct gtagtgggtg catctatttc accctctacc tgccacacat cctgtgcttc 2340  
gcctggcagg accgcatgac cgctgagctg aagaaggctg tgagcttact gtctccggtg 2400  
gcatttggat ttggcactga gtacctggtt cgctttgaag agcaaggcct ggggctgcag 2460  
tggagcaaca tcgggaacag tcccacggaa ggggacgaat tcagcttccct gctgtccatg 2520  
cagatgatgc tccttgatgc tgctgtctat ggcttactcg cttggtacct tgatcaggtg 2580  
tttccaggag actatggaac cccacttcc tgggtactttc ttctacaaga gtcgtattgg 2640  
cttggcgggtg aaggggtgtc aaccagagaa gaaagagccc tggaaaagac cgagccccta 2700  
acagaggaaa cggaggatcc agagcaccca gaaggaatac acgactcctt ctttgaacgt 2760  
gagcatccag ggtgggttcc tggggtatgc gtgaagaatc tggtaaagat ttttgagccc 2820  
tgtggccggc cagctgtgga ccgtctgaac atcaccttct acgagaacca gatcaccgca 2880  
ttcctgggcc acaatggagc tgggaaaacc accacctt 2918

- 5 <210> 10
- <211> 130
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

10 <220>

# ES 2 704 677 T3

<223> sintético

<400> 10

aggaacccct agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

5 gagcgcgcag 130

<210> 11

<211> 4540

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> sintético

15 <400> 11

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctcg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcaact 120

aggggttctt tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180

aggaagatct tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca 240

atattggcta ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg 300

gctcatgtcc aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat 360

caattacggg gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg 420

taaatggccc gcctggctga ccgcccacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt 480

atgttcccat agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac 540

ggtaaactgc ccacttgga gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg ccccctattg 600

acgtcaatga cggtaaattg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact 660

ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt 720

ggcagtacac caatgggctg ggatagcggc ttgactcacg gggatttcca agtctccacc 780

ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaaatgtc 840

gtaataaacc cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg gaggtctata 900

taagcagagc tcgttttagtg aaccgtcaga tcactagaag ctttattgcy gtagtttatc 960

acagttaaatt tgctaacgca gtcagtgctt ctgacacaac agtctcgaac ttaagctgca 1020

ES 2 704 677 T3

gaagttggtc gtgaggcact gggcaggtaa gtatcaaggt tacaagacag gtttaaggag 1080  
 accaatagaa actgggcttg tcgagacaga gaagactctt gcgtttctga taggcaccta 1140  
 ttggtccttac tgacatccac tttgcctttc tctccacagg tgtccactcc cagttcaatt 1200  
 acagctctta aggctagagt acttaatacg actcactata ggctagcctc gagaattcac 1260  
 gcgtggtacc tctagagtcg acccgggicgg ccgccatggg cttegtgaga cagatacagc 1320  
 ttttgctctg gaagaactgg accctgcgga aaaggcaaaa gattcgcttt gtggtggaac 1380  
 tcgtgtggcc tttatcttta tttctggtct tgatctgggt aaggaatgcc aaccgctct 1440  
 acagccatca tgaatgccat ttcccaaca aggcgatgcc ctccagcagga atgctgccgt 1500  
 ggctccaggg gatcttctgc aatgtgaaca atccctgttt tcaaagcccc accccaggag 1560  
 aatctcctgg aattgtgtca aactataaca actccatctt ggcaagggtat tatcgagatt 1620  
 ttcaagaact cctcatgaat gcaccagaga gccagcacct tggccgtatt tggacagagc 1680  
 tacacatctt gtcccaatc atggacaccc tccggactca cccggagaga attgcaggaa 1740  
 gaggaattcg aataagggat atcttgaaag atgaagaac actgacacta tttctcatta 1800  
 aaaacatcgg cctgtctgac tcagtggctc acctctgat caactctcaa gtccgtccag 1860  
 agcagttcgc tcatggagtc ccggacctgg cgctgaagga catcgctgc agcgaggccc 1920  
 tcctggagcg cttcatcatc ttcagccaga gacgcggggc aaagacggtg cgctatgcc 1980  
 tgtgtccct ctccagggc accctacagt ggatagaaga cactctgtat gccaacgtgg 2040  
 acttcttcaa gctcttccgt gtgcttcca cactcctaga cagccgttct caaggtatca 2100  
 atctgagatc ttggggagga atattatctg atatgtcacc aagaattcaa gagtttatcc 2160  
 atcggccgag tatgcaggac ttgctgtggg tgaccaggcc cctcatgcag aatggtggtc 2220  
 cagagacctt taaaaagctg atgggcatcc tgtctgacct cctgtgtggc taccgagag 2280  
 gaggtggctc tcgggtgctc tccttcaact ggtatgaaga caataactat aaggcctttc 2340  
 tggggattga ctccacaagg aaggatccta tctattctta tgacagaaga acaacatcct 2400  
 tttgtaatgc attgatccag agcctggagt caaatccttt aaccaaaatc gcttgagggg 2460  
 cggcaaagcc tttgctgatg ggaaaaatcc tgtacactcc tgattcacct gcagcacgaa 2520  
 ggatactgaa gaatgccaac tcaacttttg aagaactgga acacgtagg aagttggtca 2580  
 aagcctggga agaagtaggg cccagatct ggtacttctt tgacaacagc acacagatga 2640  
 acatgatcag agataccctg gggaacccaa cagtaaaaga ctttttgaat aggcagcttg 2700  
 gtgaagaagg tattactgct gaagccatcc taaacttctt ctacaagggc cctcgggaaa 2760  
 gccaggctga cgacatggcc aacttcgact ggagggacat atttaacatc actgatcgca 2820  
 ccctccgctt tgtcaatcaa tacctggagt gcttggctct ggataagttt gaaagctaca 2880

ES 2 704 677 T3

atgatgaaac tcagctcacc caacgtgccc tctctctact ggaggaaaac atgttctggg 2940  
 ccggagtggg attccctgac atgtatccct ggaccagctc tctaccaccc cacgtgaagt 3000  
 ataagatccg aatggacata gacgtggtgg agaaaaccaa taagattaaa gacaggtatt 3060  
 gggattctgg tcccagagct gatcccgtgg aagatttccg gtacatctgg ggcgggtttg 3120  
 cctatctgca ggacatgggt gaacagggga tcacaaggag ccaggtgcag gcggaggctc 3180  
 cagttggaat ctacctccag cagatgccct acccctgctt cgtggacgat tctttcatga 3240  
 tcacctgaa ccgctgtttc cctatcttca tgggtctggc atggatctac tctgtctcca 3300  
 tgactgtgaa gagcatcgtc ttggagaagg agttgcgact gaaggagacc ttgaaaaatc 3360  
 aggtgtctc caatgcagtg atttggtgta cctggttccct ggacagcttc tccatcatgt 3420  
 cgatgagcat cttcctcctg acgatattca tcatgcatgg aagaatccta cattacagcg 3480  
 acccattcat cctcttctg ttcttgttgg ctttctccac tgccaccatc atgctgtgct 3540  
 ttctgctcag caccttcttc tccaaggcca gtctggcagc agcctgtagt ggtgtcatct 3600  
 atttcacct ctacctgcca cacatcctgt gcttcgctg gcaggaccgc atgaccgctg 3660  
 agctgaagaa ggctgtgagc ttactgtctc cgggtggcatt tggatttggc actgagtacc 3720  
 tggttcgctt tgaagagcaa ggcctggggc tgcaagtggag caacatcggg aacagtccca 3780  
 cggaaagggga cgaattcagc ttctgctgt ccatgcagat gatgctcctt gatgctgctg 3840  
 tctatggctt actcgcttgg taccttgatc aggtgtttcc aggagactat ggaacccac 3900  
 ttcttggta ctttcttcta caagagtcgt attggttgg cgggtgaaggg tgttcaacca 3960  
 gagaagaaag agccctggaa aagaccgagc ccctaacaga ggaaacggag gatccagagc 4020  
 acccagaagg aatacacgac tccttctttg aacgtgagca tccagggtgg gttcctgggg 4080  
 tatgctgaa gaatctgga aagattttg agccctgtgg ccggccagct gtggaccgtc 4140  
 tgaacatcac cttctacgag aaccagatca ccgcattcct gggccacaat ggagctggga 4200  
 aaaccaccac cttgtaagta tcaaggttac aagacaggtt taaggagacc aatagaaact 4260  
 gggcttgtcg agacagagaa gactcttgcg tttctgggat tttgccgatt tcggcctatt 4320  
 ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt 4380  
 ttataatttc aggtggcatc tttccaattg aggaaccctc agtgatggag ttggccactc 4440  
 cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagc ccgggcgacc aaaggctcgc cgacgcccgg 4500  
 gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag 4540

<210> 12  
 <211> 3978  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> sintético

10

<400> 12

ES 2 704 677 T3

gtccatcctg acgggtctgt tgccaccaac ctctgggact gtgctcgttg ggggaagga 60  
cattgaaacc agcctggatg cagtccggca ggccttggc atgtgtccac agcacaacat 120  
cctgttccac cacctcacgg tggctgagca catgctgttc tatgccagc tgaaaggaaa 180  
gtcccaggag gaggcccagc tggagatgga agccatggtg gaggacacag gcctccacca 240  
caagcggat gaagaggctc aggacctatc aggtggcatg cagagaaagc tgtcggttgc 300  
cattgccttt gtgggagatg ccaaggtggt gattctggac gaaccacct ctggggtgga 360  
cccttactcg agacgctcaa tctgggatct gctcctgaag tatcgctcag gcagaacat 420  
catcatgtcc actcaccaca tggacgagc cgacctcctt ggggaccgca ttgccatcat 480  
tgcccagga aggctctact gctcaggcac cccactcttc ctgaagaact gctttggcac 540  
aggctgtac ttaaccttgg tgcgcaagat gaaaaacatc cagagccaaa ggaaaggcag 600  
tgaggggacc tgcagctgct cgtctaagg tttctccacc acgtgtccag cccacgtcga 660  
tgacctaaact ccagaacaag tcttgatgg ggatgtaaat gagctgatgg atgtagtct 720  
ccaccatggt ccagaggcaa agctggtgga gtgcattggt caagaactta tcttccttct 780  
tccaaataag aacttcaagc acagagcata tgccagcctt ttcagagagc tggaggagac 840  
gctggctgac ctgtgtctca gcagttttgg aatttctgac actcccctgg aagagatfff 900  
tctgaaggtc acggaggatt ctgattcagg acctctgttt gcgggtggcg ctcagcagaa 960  
aagagaaaac gtcaaccccc gacaccctg cttgggtccc agagagaagg ctggacagac 1020  
accccaggac tccaatgtct gctcccagg ggcgccggct gtcaccagc agggccagcc 1080  
tccccagag ccagagtgcc caggcccgca gctcaacacg gggacacagc tggctctcca 1140  
gcatgtgcag gcgctgctgg tcaagagatt ccaacacacc atccgcagcc acaaggactt 1200  
cctggcgcag atcgtgctcc cggctacett tgtgtttttg gctctgatgc tttctattgt 1260  
tatccctcct tttggcgaat accccgcttt gaccctcac ccctggatat atgggcagca 1320  
gtacaccttc ttcagcatgg atgaaccagg cagtgagcag ttcacggtag ttgcagacgt 1380  
cctcctgaat aagccaggct ttggcaaccg ctgcctgaag gaaggggtgc ttccggagta 1440  
cccctgtggc aactcaacac cctggaagac tccttctgtg tccccaaaca tcaccagct 1500  
gttccagaag cagaaatgga cacaggtcaa cccttcacca tcctgcaggt gcagcaccag 1560  
ggagaagctc accatgctgc cagagtgcgc cgaggggtgc gggggcctcc cccccccca 1620  
gagaacacag cgcagcacgg aaattctaca agacctgacg gacaggaaca tctccgactt 1680  
cttggtaaaa acgtatcctg ctcttataag aagcagctta aagagcaaat tctgggtcaa 1740  
tgaacagagg tatggaggaa tttccattgg aggaaagctc ccagtcgtcc ccatcacggg 1800

ES 2 704 677 T3

ggaagcactt gttgggtttt taagcgacct tggccggatc atgaatgtga gcgggggccc 1860  
 taccactaga gaggcctcta aagaaatacc tgatttcctt aaacatctag aaactgaaga 1920  
 caacattaag gtgtgggttta ataacaaagg ctggcatgcc ctggtcagct ttctcaatgt 1980  
 ggcccacaac gccatcttac gggccagcct gcctaaggac agaagccccg aggagtatgg 2040  
 aatcaccgtc attagccaac ccctgaacct gaccaaggag cagctctcag agattacagt 2100  
 gctgaccact tcagtggatg ctgtggttgc catctgcgtg attttctcca tgccttcgt 2160  
 cccagccage tttgtccttt atttgatcca ggagcgggtg aacaaatcca agcacctcca 2220  
 gtttatcagt ggagtgagcc ccaccaccta ctgggtaacc aacttcctct gggacatcat 2280  
 gaattattcc gtgagtgtg ggctggtgtt gggcatcttc atcgggttcc agaagaaagc 2340  
 ctacacttct ccagaaaacc ttctgcctt tgtggcactg ctctgtctgt atggatgggc 2400  
 ggtcattccc atgatgtacc cagcatcctt cctgtttgat gtccccagca cagcctatgt 2460  
 ggctttatct tgtgctaatac tgttcatcgg catcaacagc agtgctatta ccttcatctt 2520  
 ggaattattt gagaataacc ggacgtgct caggttcaac gccgtgctga ggaagctgct 2580  
 cattgtcttc ccccacttct gcctgggccc gggcctcatt gaccttgca ttagccaggc 2640  
 tgtgacagat gtctatgccc ggtttggtga ggagcactct gcaaaccctg tccactggga 2700  
 cctgattggg aagaacctgt ttgccatggt ggtggaaggg gtggtgtact tcctcctgac 2760  
 cctgctggtc cagcgcact tcttctctc ccaatggatt gccgagccca ctaaggagcc 2820  
 cattgttgat gaagatgatg atgtggctga agaaagacaa agaattatta ctggtgaaa 2880  
 taaaactgac atcttaaggc tacatgaact aaccaagatt tatccaggca cctccagccc 2940  
 agcagtggac aggctgtgtg toggagtctg ccctggagag tgctttggcc tcctgggagt 3000  
 gaatggtgcc ggcaaaaacaa ccacattcaa gatgctcact ggggacacca cagtgacctc 3060  
 aggggatgcc accgtagcag gcaagagtat tttaaccaat atttctgaag tccatcaaaa 3120  
 tatgggctac tgtcctcagt ttgatgcaat cgatgagctg ctccacaggac gagaacatct 3180  
 ttacctttat gcccgcttc gaggtgtacc agcagaagaa atcgaaaagg ttgcaaaactg 3240  
 gagtattaag agcctgggccc tgactgtcta cgccgactgc ctggctggca cgtacagtgg 3300  
 gggcaacaag cggaaaactct ccacagccat cgcactcatt ggctgcccac cgtggtgct 3360  
 gctggatgag cccaccacag ggatggaccc ccaggcacgc cgcagtctgt ggaacgtcat 3420  
 cgtgagcatc atcagagaag ggagggtgt ggtcctcaca tcccacagca tgaagaatg 3480  
 tgaggcactg tgtaccggc tggccatcat ggtaaaaggc gcctttcgat gtatgggac 3540  
 cattcagcat ctcaagtcca aatttgaga tggctatct gtcacaatga agatcaaactc 3600  
 cccgaaggac gacctgcttc ctgacctgaa ccctgtggag cagttcttcc aggggaactt 3660  
 cccaggcagt gtgcagaggg agaggcacta caacatgctc cagttccagg tctcctcctc 3720  
 ctccctggcg aggatcttcc agctcctcct ctcccacaag gacagcctgc tcatcgagga 3780  
 gtactcagtc acacagacca cactggacca ggtgtttgta aattttgcta aacagcagac 3840  
 tgaaagtcat gacctcctc tgcaccctcg agctgctgga gccagtcgac aagcccagga 3900  
 cgactacaaa gaccatgacg gtgattataa agatcatgac atcgactaca aggatgacga 3960  
 tgacaagtga gcggccgc 3978

ES 2 704 677 T3

<211> 261  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> sintético

<400> 13

ttcgagcaga catgataaga tacattgatg agtttggaca aaccacaact agaatgcagt 60  
 gaaaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttcta accattataa 120  
 gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag gttcaggggg 180  
 agatgtggga ggttttttaa agcaagtaaa acctctacaa atgtggtaaa atcgataagg 240  
 10 atcttcctag agcatggcta c 261

<210> 14  
 <211> 175  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> sintético

20 <400> 14

tcactgctta caaaaccccc ttgcttgaga gtgtggcact ctccccctg tcgcttctgc 60  
 tcgctcgctg gctcgtttgg gggggcgagc gccagagggc cgctgtctgg cagctctttg 120  
 agctgccacc cccccaaacg agccagcgag cgagcgaacg cgacaggggg gagag 175

<210> 15  
 <211> 4636  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> sintético

30 <400> 15

ctgctgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggctcg ggcgacctt 60  
 ggtcgcccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcaact 120  
 aggggttctt ggatccggga ttttgccgat ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat 180  
 35

ES 2 704 677 T3

ttaacaaaaa ttttaacgca attttaacaa aatattaacg tttataatth caggtggcat 240  
 ctttcgatag gcacctattg gtcttactga catccactth gcctthctct ccacaggtcc 300  
 atcctgacgg gtctgttgcc accaacctct gggactgtgc tcggtggggg aagggacatt 360  
 gaaaccagcc tggatgcagt ccggcagagc cttggcatgt gtccacagca caacatcctg 420  
 ttccaccacc tcacggtggc tgagcacatg ctgttctatg ccagctgaa aggaaagtcc 480  
 caggaggagg ccagctgga gatggaagcc atggtggagg acacaggcct ccaccacaag 540  
 cggaatgaag aggetcagga cctatcaggt ggcattgcaga gaaagctgtc ggttgccatt 600  
 gcctthgtgg gagatgcaa ggtggtgatt ctggacgaac ccacctctgg ggtggaccct 660  
 tactcgagac gctcaatctg ggatctgctc ctgaagtatc gctcaggcag aaccatcatc 720  
 atgtccactc accacatgga cgaggccgac ctccctgggg accgcattgc catcattgcc 780  
 cagggaaggc tctactgctc aggcacccca ctcttctga agaactgctt tggcacaggc 840  
 ttgtacttaa ccttgggtgc caagatgaaa aacatccaga gccaaaggaa aggcagtgag 900  
 gggacctgca gctgctcgtc taagggtttc tccaccacgt gtccagccca cgtcgatgac 960  
 ctaactccag aacaagtcct ggatggggat gtaaatgagc tgatggatgt agttctccac 1020  
 catgttccag aggcaaagct ggtggagtgc atgggtcaag aacttatctt ccttcttcca 1080  
 aataagaact tcaagcacag agcatatgcc agcctthtca gagagctgga ggagacgctg 1140  
 gctgacctg gtctcagcag ttttggaaatt tctgacactc ccctggaaga gattthtctg 1200  
 aaggtcacgg aggattctga ttcaggacct ctgthtgcgg gtggcgctca gcagaaaaga 1260  
 gaaaaagtc accccgaca cccctgcttg ggtcccagag agaaggctgg acagacaccc 1320  
 caggactcca atgtctgctc ccagggggc cggctgctc acccagaggg ccagcctccc 1380  
 ccagagccag agtgcccag cccgagctc aacacgggga cacagctggt cctccagcat 1440  
 gtgcaggcgc tgctgggtcaa gagattccaa cacaccatcc gcagccacaa ggacttctg 1500  
 ggcagatcg tgctcccggc tacctthgtg tthtggctc tgatgctthc tattgttatc 1560  
 cctccttht gccaataccc cgctthgacc ctccaccct ggatatatgg gcagcagtac 1620  
 acctcttca gcatggatga accaggcagt gagcagttca cggacttgc agacgtcctc 1680  
 ctgaataagc caggctthtgc caaccgctgc ctgaaggaa ggtggcttcc ggagtacccc 1740  
 tgtggcaact caacaccctg gaagactcct tctgtgtccc caaacatcac ccagctgttc 1800  
 cagaagcaga aatggacaca ggtcaacctc tcaccatcct gcaggtgcag caccaggag 1860  
 aagctacca tgctccaga gtgccccgag ggtgccggg gcctcccgcc cccccagaga 1920  
 acacagcga gcacggaaat tctacaagac ctgacggaca ggaacatctc cgacttctg 1980  
 gtaaaaacgt atcctgctct tataagaagc agcttaaaga gcaaattctg ggtcaatgaa 2040  
 cagaggtatg gaggaatttc cattggagga aagctcccag tcgtcccat cacgggggaa 2100



ES 2 704 677 T3

gcacttggtg ggtttttaag cgaccttggc cggatcatga atgtgagcgg gggccctatc 2160  
actagagagg cctctaaaga aatacctgat ttccttaaac atctagaaac tgaagacaac 2220  
attaaggtgt ggtttaataa caaaggctgg catgccctgg tcagctttct caatgtggcc 2280  
cacaacgcca tcttacgggc cagcctgcct aaggacagaa gccccgagga gtatggaatc 2340  
accgtcatta gccaacccct gaacctgacc aaggagcagc tctcagagat tacagtgctg 2400  
accacttcag tggatgctgt ggttgccatc tgcgtgattt tctccatgtc cttcgtccca 2460  
gccagctttg tcctttatth gatccaggag cgggtgaaca aatccaagca cctccagttt 2520  
atcagtggag tgagccccac cacctactgg gtaaccaact tcctctggga catcatgaat 2580  
tattccgtga gtgctgggct ggtggtgggc atcttcatcg ggtttcagaa gaaagcctac 2640  
acttctccag aaaaccttcc tgccttctg gcactgctcc tgctgtatgg atgggcggtc 2700  
attcccatga tgtaccagc atccttctg tttgatgtcc ccagcacagc ctatgtggct 2760  
ttatcttgtg ctaatctgth catcggcatc aacagcagtg ctattacctt catcttgaa 2820  
ttatttgaga ataaccggac gctgctcagg ttcaacgccg tgctgaggaa gctgctcatt 2880  
gtcttcccc acttctgcct gggccggggc ctcatgacc ttgactgag ccaggctgtg 2940  
acagatgtct atgcccggth tggtagagg cactctgcaa atccgthcca ctgggacctg 3000  
attggaaga acctgtttgc catggtggtg gaaggggtgg tgtacttctt cctgacctg 3060  
ctggtccagc gccacttctt cctctoccaa tggattgccc agcccactaa ggagcccatt 3120  
gttgatgaag atgatgatgt ggctgaagaa agacaaagaa ttattactgg tggaaataaa 3180  
actgacatct taaggctaca tgaactaacc aagatttata caggcacctc cagcccagca 3240  
gtggacaggc tgtgtgtcgg agttcggcct ggagagtgtt ttggcctcct gggagtgaat 3300  
ggtgccggca aaacaaccac attcaagatg ctactgagg acaccacagt gacctcaggg 3360  
gatgccaccg tagcaggcaa gagtattth accaatatth ctgaagtcca tcaaaatag 3420  
ggctactgtc ctcagtthga tgcaatcgat gagctgctca caggacgaga acatctttac 3480  
ctttatgccc ggcttcgagg tgtaccagca gaagaaatcg aaaaggttgc aaactggagt 3540  
attaagagcc tgggcctgac tgtctacgcc gactgcctgg ctggcacgta cagtgggggc 3600  
aacaagcgga aactctccac agccatcgca ctcatggct gccaccgct ggtgctgctg 3660  
gatgagccca ccacaggat ggacccccag gcacgccga tgctgtggaa cgtcatcgtg 3720  
agcatcatca gagaaggag ggctgtggtc ctccatccc acagcatgga agaatgtgag 3780  
gcactgtgta ccoggctggc catcatggta aagggcgctt ttgatgtat gggcaccatt 3840  
cagcatctca agtccaaatt tggagatggc tatatcgtca caatgaagat caaatccccg 3900  
aaggacgacc tgcttctgca cctgaaccct gtggagcagt tcttccaggg gaacttccca 3960

ES 2 704 677 T3

ggcagtgtgc agagggagag gcactacaac atgctccagt tccaggtctc ctccctctcc 4020  
 ctggcgagga tcttccagct cctcctctcc cacaaggaca gcctgctcat cgaggagtac 4080  
 tcagtccacac agaccacact ggaccaggtg tttgtaaatt ttgctaaaca gcagactgaa 4140  
 agtcatgacc tccctctgca ccctcgagct gctggagcca gtcgacaagc ccaggactga 4200  
 gcgcccgctt cgagcgagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag 4260  
 aatgcagtga aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttghtaac 4320  
 cattataagc tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt 4380  
 tcagggggag atgtgggagg ttttttaaag caagtaaac ctctacaaat gtggtaaaat 4440  
 cgataaggat cttcctagag catggctacg tagataagta gcatggcggg ttaatcatta 4500  
 actacaagga acccctagtg atggagttgg ccaactccctc tctgcgctc cgctcgctca 4560  
 ctgagggcgg gcgaccaaag gtcgcccagc gcccgggctt tgcccgggcg gcctcagtga 4620  
 gcgagcgagc gcgcag 4636

<210> 16  
 <211> 4431  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> sintético

10

<400> 16

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggctcg ggcgacctt 60  
 ggtcgccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gaggggcaa ctccatcaact 120  
 aggggttctt ttagttaat gattaaccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180  
 aggaagatct tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca 240  
 atattggcta ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg 300  
 gctcatgtcc aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat 360  
 caattacggg gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg 420  
 taaatggccc gcctggctga ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataagacgt 480  
 atgttcccat agtaacgcca ataggactt tccattgacg tcaatgggtg gaggatttac 540  
 ggtaaacctgc ccacttgca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtccg ccccctattg 600  
 acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact 660  
 ttcctacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt 720  
 ggcagtacac caatggcgct ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc 780  
 ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaaatgtc 840  
 gtaataaacc cgccccgttg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata 900

ES 2 704 677 T3

taagcagagc	tcgtttagtg	aaccgtcaga	tactagaag	ctttattgcg	gtagtttatac	960
acagttaaat	tgctaacgca	gtcagtgctt	ctgacacaac	agtctcgaac	ttaagctgca	1020
gaagtggtc	gtgaggcact	gggcaggtaa	gtatcaaggt	tacaagacag	gtttaaggag	1080
accaatagaa	actgggcttg	tcgagacaga	gaagactcct	gcgtttctga	taggcaccta	1140
ttggtcttac	tgacatccac	tttgcccttc	tctccacagg	tgtccactcc	cagttcaatt	1200
acagctctta	aggctagagt	acttaatacg	actcactata	ggctagcctc	gagaattcac	1260
gcgtggtagc	tctagagtcg	acccgggctg	ccgcatggg	cttcgtgaga	cagatacagc	1320
ttttgctctg	gaagaactgg	accctgcgga	aaaggcaaaa	gattcgcttt	gtggtggaac	1380
tcgtgtggcc	tttatcttta	tttctggtct	tgatctgggt	aaggaatgcc	aaccgctct	1440
acagccatca	tgaatgccat	ttcccccaaca	aggcgatgcc	ctcagcagga	atgctgccgt	1500
ggctccaggg	gatcttctgc	aatgtgaaca	atccctgttt	tcaaagcccc	acccagggag	1560
aatctcctgg	aattgtgtca	aactataaca	actccatctt	ggcaagggta	tatcgagatt	1620
ttcaagaact	cctcatgaat	gcaccagaga	gccagcacct	tggccgtatt	tggacagagc	1680
tacacatctt	gtoccaattc	atggacaccc	tccgactca	cccggagaga	attgcaggaa	1740
gaggaattcg	aataagggat	atcttgaaag	atgaagaac	actgacacta	tttctcatta	1800
aaaacatcgg	cctgtctgac	tcagtggctc	accttctgat	caactctcaa	gtccgtccag	1860
agcagttcgc	tcatggagtc	ccggacctgg	cgctgaagga	catcgctgc	agcgaggccc	1920
tcctggagcg	cttcatcatc	ttcagccaga	gacgcggggc	aaagacggtg	cgctatgccc	1980
tgtgtccctc	ctcccagggc	accctacagt	ggatagaaga	cactctgtat	gccaacgtgg	2040
acttcttcaa	gctcttccgt	gtgcttccca	cactcctaga	cagccgttct	caaggtatca	2100
atctgagatc	ttggggagga	atattatctg	atatgtcacc	aagaattcaa	gagtttatcc	2160
atcgccgag	tatgcaggac	ttgctgtggg	tgaccaggcc	cctcatgcag	aatggtggtc	2220
cagagacctt	tacaaagctg	atgggcatcc	tgtctgacct	cctgtgtggc	taccccgagg	2280
gaggtggctc	tcgggtgctc	tccttcaact	ggtatgaaga	caataactat	aaggcctttc	2340
tggggattga	ctocacaagg	aaggatccta	tctattctta	tgacagaaga	acaacatcct	2400
tttghtaatgc	attgatccag	agcctggagt	caaatccttt	aaccaaaatc	gcttggaggg	2460
cggcaaagcc	tttgctgatg	ggaaaaatcc	tgtacactcc	tgattcacct	gcagcacgaa	2520
ggatactgaa	gaatgccaac	tcaacttttg	aagaactgga	acacgtagg	aagttggtca	2580
aagcctggga	agaagtaggg	ccccagatct	ggtacttctt	tgacaacagc	acacagatga	2640
acatgatcag	agataccctg	gggaacccaa	cagtaaaaga	ctttttgaat	aggcagcttg	2700
gtgaagaagg	tattactgct	gaagccatcc	taaacttctc	ctacaagggc	cctcgggaaa	2760

ES 2 704 677 T3

gccaggtga cgacatggcc aacttcgact ggagggacat atttaacatc actgatcgca 2820  
 ccctccgctt tgtcaatcaa tacctggagt gcttggcctt ggataagttt gaaagctaca 2880  
 atgatgaaac tcagctcacc caacgtgccc tctctctact ggaggaaaac atgttctggg 2940  
 ccggagtggg attccctgac atgtatccct ggaccagctc tctaccacc cactgaagt 3000  
 ataagatccg aatggacata gacgtggtgg agaaaaccaa taagattaaa gacaggtatt 3060  
 gggattctgg tcccagagct gatcccgctg aagatttccg gtacatctgg ggcgggtttg 3120  
 cctatctgca ggacatgggt gaacagggga tcacaaggag ccaggtgcag gcggaggctc 3180  
 cagttggaat ctacctccag cagatgccct acccctgctt cgtggacgat tctttcatga 3240  
 tcatcctgaa ccgctgtttc cctatcttca tgggtctggc atggatctac tctgtctcca 3300  
 tgactgtgaa gagcatcgtc ttggagaagg agttgcgact gaaggagacc ttgaaaaatc 3360  
 aggggtgtct caatgcagtg atttgggtga cctggttccct ggacagcttc tccatcatgt 3420  
 cgatgagcat cttcctcctg acgatattca tcatgcatgg aagaatccta cattacagcg 3480  
 acccattcat cctcttccctg ttcttgttgg ctttctccac tgccaccatc atgctgtgct 3540  
 ttctgctcag caccttcttc tocaaggcca gtctggcagc agcctgtagt ggtgtcatct 3600  
 atttaccctt ctacctgcca cacatcctgt gcttcgcctg gcaggaccgc atgaccgctg 3660  
 agctgaagaa ggctgtgagc ttactgtctc cgggtggcatt tggatttggc actgagtacc 3720  
 tggttcgctt tgaagagcaa ggcctggggc tgcagtggag caacatcggg aacagtccca 3780  
 cggaaagggg cgaattcagc ttctgctgtt ccatgcagat gatgctcctt gatgctgctg 3840  
 tctatggctt actcgcttgg taccttgatc aggtgtttcc aggagactat ggaacccac 3900  
 ttcttggta ctttcttcta caagagtcgt attggcttgg cgggtgaaggg tgttcaacca 3960  
 gagaagaaag agccctggaa aagaccgagc ccctaacaga ggaaacggag gatccagagc 4020  
 acccagaagg aatacacgac tccttctttg aacgtgagca tccaggggtg gttcctgggg 4080  
 tatgctgaa gaatctggta aagatttttg agccctgtgg ccggccagct gtggaccgtc 4140  
 tgaacatcac cttctacgag aaccagatca ccgcattcct gggccacaat ggagctggga 4200  
 aaaccaccac cttgtaagta tcaaggttac aagacaggtt taaggagacc aatagaaact 4260  
 gggcttgtcg agacagagaa gactcttgcg tttctcaatt gaggaacccc tagtgatgga 4320  
 gttggccact ccctctctgc gcgctcgtc gctcactgag gccgggagc caaaggtcgc 4380  
 ccgacgcccg ggctttgccg gggcggcctc agtgagcagc cgagcgcgca g 4431

<210> 17  
 <211> 4521  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> sintético

10

<400> 17

ES 2 704 677 T3

ctgcgcgctc gctcgcctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggctcgc ggcgaccttt 60  
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gaggggccaa ctccatcact 120  
aggggttctt gataggcacc tatttgtctt actgacatcc actttgcctt tctctccaca 180  
ggtccatcct gacgggtctg ttgccaccaa cctctgggac tgtgctcgtt gggggaaggg 240  
acattgaaac cagcctggat gcagtccggc agagccttg catgtgtcca cagcacaaca 300  
tcctgttcca ccacctcacg gtggctgagc acatgctgtt ctatgccag ctgaaaggaa 360  
agtcccagga ggaggccag ctggagatgg aagccatggt ggaggacaca ggcctccacc 420  
acaagcggaa tgaagaggct caggacctat cagggtggcat gcagagaaag ctgtcggttg 480  
ccattgcctt tgtgggagat gccaaagtgg tgattctgga cgaaccacc tctgggtgg 540  
accctactc gagacgctca atctgggatc tgctcctgaa gtatcgctca ggcagaacca 600  
tcatcatgct cactcaccac atggacgagg ccgacctcct tggggaccgc attgccatca 660  
ttgccaggga aaggtcttac tgctcaggca cccactctt cctgaagaac tgctttggca 720  
caggcttgta cttaaccttg gtgcgcaaga tgaaaaacat ccagagccaa aggaaaggca 780  
gtgaggggac ctgcagctgc tcgtctaagg gtttctccac cacgtgtcca gccacgctgc 840  
atgacctaac tccagaacaa gtcctggatg gggatgtaa tgagctgatg gatgtagttc 900  
tccaccatgt tccagaggca aagctggtgg agtgcatggt tcaagaactt atcttccttc 960  
ttccaaataa gaacttcaag cacagagcat atgccagcct tttcagagag ctggaggaga 1020  
cgctggtga ccttggcttc agcagttttg gaatttctga cactcccctg gaagagattt 1080  
ttctgaaggt cacggaggat tctgattcag gacctctgtt tgcgggtggc gctcagcaga 1140  
aaagagaaaa cgtcaacccc cgacaccctt gcttgggtcc cagagagaag gctggacaga 1200  
caccacagga ctccaatgct tgctccccag gggcgccggc tgctcaccca gagggccagc 1260  
ctccccaga gccagagtgc ccaggcccgc agctcaacac ggggacacag ctggtcctcc 1320  
agcatgtgca ggcgctgctg gtcaagagat tccaacacac catccgcagc cacaaggact 1380  
tcctggcgca gatcgtgctc cgggtacct ttgtgttttt ggctctgatg ctttctattg 1440  
ttatccctcc ttttggcgaa taccctgctt tgaccttca cccctggata tatgggcagc 1500  
agtacacctt cttcagcatg gatgaaccag gcagtgagca gttcacggta cttgcagacg 1560  
tcctcctgaa taagccaggc tttggcaacc gctgcctgaa ggaagggtgg cttccggagt 1620  
accctgtgg caactcaaca ccctggaaga ctcttctgt gtccccaaac atcaccagc 1680  
tgttccagaa gcagaaatgg acacaggtca acccttcacc atcctgcagg tgcagcacca 1740  
gggagaagct caccatgctg ccagagtgcc ccgagggctc cgggggcctc ccgccccccc 1800

ES 2 704 677 T3

agagaacaca gcgcagcacg gaaattctac aagacctgac ggacaggaac atctccgact 1860  
 tcttggtaaa aacgtatcct gctcttataa gaagcagctt aaagagcaaa ttctgggtca 1920  
 atgaacagag gtatggagga atttccattg gaggaaagct cccagtcgtc cccatcacgg 1980  
 gggaaagcact tgttgggttt ttaagcgacc ttggccggat catgaatgtg agcgggggcc 2040  
 ctatcactag agaggcctct aaagaaatac ctgatttctt taaacatcta gaaactgaag 2100  
 acaacattaa ggtgtgggtt aatacaaaag gctggcatgc cctggtcagc tttctcaatg 2160  
 tggcccaaaa cgccatctta cgggcccagcc tgcctaagga cagaagcccc gaggagtatg 2220  
 gaatcaccgt cattagccaa cccctgaacc tgaccaagga gcagctctca gagattacag 2280  
 tgctgaccac ttcagtggat gctgtggtt ccatctgcgt gatcttctcc atgtccttcg 2340  
 tcccagccag ctttgcctt tatttgatcc aggagcgggt gaacaaatcc aagcacctcc 2400  
 agtttatcag tggagtgagc cccaccacct actgggtaac caacttcctc tgggacatca 2460  
 tgaattattc cgtgagtgtc gggctggtgg tgggcatctt catcgggttt cagaagaaag 2520  
 cctacacttc tccagaaaac cttcctgccc ttgtggcact gctcctgctg tatggatggg 2580  
 cggtcattcc catgatgtac ccagcatcct tcctgtttga tgtcccagc acagcctatg 2640  
 tggctttatc ttgtgctaata ctgttcctgc gcatcaacag cagtgtctatt accttcctc 2700  
 tggattatt tgagaataac cggacgtgc tcaggttcaa cgccgtgctg aggaagctgc 2760  
 tcattgtctt cccccacttc tgcctgggcc ggggcctcat tgaccttga ctgagccagg 2820  
 ctgtgacaga tgtctatgcc cggtttgggtg aggagcactc tgcaaatccg ttccactggg 2880  
 acctgattgg gaagaacctg tttgccatgg tgggtggaagg ggtggtgtac ttctcctga 2940  
 ccctgctggt ccagcggcac ttcttcctct cccaatggat tgccgagccc actaaggagc 3000  
 ccattgttga tgaagatgat gatgtggctg aagaaagaca aagaattatt actggtggaa 3060  
 ataaaactga catcttaagg ctacatgaac taaccaagat ttatccaggc acctccagcc 3120  
 cagcagtgga caggctgtgt gtcggagttc gccctggaga gtgctttggc ctctggggag 3180  
 tgaatggtgc cggcaaaaaca accacattca agatgtctac tggggacacc acagtgcct 3240  
 caggggatgc caccgtagca ggcaagagta ttttaaccaa ttttctgaa gtccatcaaa 3300  
 atatgggcta ctgtcctcag tttgatgcaa tcgatgagct gctcacagga cgagaacatc 3360  
 tttaccttta tgcccggctt cgaggtgtac cagcagaaga aatcgaaaag gttgcaaaact 3420  
 ggagtattaa gagcctgggc ctgactgtct acgccgactg cctggctggc acgtacagtg 3480  
 ggggcaaaa gcggaactc tccacagcca tcgactcat tggctgccc cagctggtgc 3540  
 tgctggatga gccaccaca gggatggacc cccaggcacg ccgcatgctg tggaacgtca 3600  
 tcgtgagcat catcagagaa gggagggctg tggctctcac atcccacagc atggaagaat 3660  
 gtgaggcact gtgtaccgg ctggccatca tggtaaaggg cgcctttcga tgtatggca 3720

ES 2 704 677 T3

ccattcagca tctcaagtcc aaatttgag atggctatat cgtcacaatg aagatcaaat 3780  
ccccgaagga cgacctgctt cctgacctga accctgtgga gcagttcttc caggggaact 3840  
tcccaggcag tgtgcagagg gagaggcact acaacatgct ccagttccag gtctcctcct 3900  
cctccctggc gaggatcttc cagctcctcc tctcccacaa ggacagcctg ctcatcgagg 3960  
agtactcagt cacacagacc aactggacc aggtgtttgt aaattttgct aacagcaga 4020  
ctgaaagtca tgacctcctt ctgcaccctc gagctgctgg agccagtcga caagcccagg 4080  
actgagcggc cgcttcgagc agacatgata agatacattg atgagtttgg acaaaccaca 4140  
actagaatgc agtgaaaaaa atgctttatt tgtgaaatth gtgatgctat tgctttatth 4200  
gtaaccatta taagctgcaa taaacaagth aacaacaaca attgcattca ttttatgthh 4260  
caggttcagg gggagatgtg ggaggththh taaagcaagt aaaacctcta caaatgtggt 4320  
aaaatcgata aggatctthc tagagcatgg ctacgtagat aagtagcatg gcgggttaat 4380  
cattaactac aaggaacccc tagtgatgga gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc 4440  
gctcactgag gccggggcag caaaggtcgc ccgacgcccg ggctttgccc gggcggcctc 4500  
agtgagcgag cgagcgcgca g 4521

<210> 18  
<211> 175  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> sintético

10 <400> 18

ctctcccccc tgtcgcgthc gctcgcctgc tggctcgthh gggggggtgg cagctcaaag 60  
agctgccaga cgacggccct ctggccgtcg ccccccaaa cgagccagcg agcgagcgaa 120  
cgcgacaggg gggagagtgc cacactctca agcaaggggg ttttgtaagc agtga 175

15 <210> 19  
<211> 400  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> sintético

<400> 19

gctagcgtgc cacctggtcg acattgatta ttgactagth attaatagta atcaattacg 60  
gggtcattag ttcatagccc atatatggag ttccgcgthh cataacttac ggtaaatggc 120  
ccgcctggct gaccgcccac cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc 180

25 atagtaacgc caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggactatth acggtaaact 240  
gccacttgg cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cggcccctat tgacgtcaat 300  
gacggtaaat ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga cttatggga ctttcctact 360  
tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg 400

<210> 20

ES 2 704 677 T3

<211> 277  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> sintético

<400> 20

tcgaggtgag cccacggtc tgcttcactc tccccatctc cccccctcc ccacccccaa 60  
 ttttgtatth atthatttht taattattht gtgcagcgat gggggcgggg gggggggggg 120  
 cgcgcgccag gcggggcggg gcggggcgag gggcggggcg gggcgaggcg gagaggtgag 180  
 gcggcgacca atcagagcgg cgcgctccga aagtttcctt ttatggcgag gcggcgcggg 240  
 10 cggcgccct ataaaaagcg aagcgcgcgg cgggcgg 277

<210> 21  
 <211> 133  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> sintético

20 <400> 21

gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg cttgtcgaga 60  
 cagagaagac tcttgcgtht ctgataggca cctattggtc ttactgacat ccactthgcc 120  
 thtctctcca cag 133

<210> 22  
 <211> 3108  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> sintético

30 <400> 22

atggtgattc ttcagcaggg ggacctgtg tggatggacc tgagattggg gcaggagttc 60  
 gacgtgcccc tcggggcggg ggtgaagctc tgcgactctg ggcaggthca ggtggtggat 120  
 gatgaagaca atgaacactg gatctctccg cagaacgcaa cgcacatcaa gcctatgcac 180  
 cccacgtcgg tccacggcgt ggaggacatg atccgcctgg gggacctcaa cgaggcgggc 240  
 atcttgcgca acctgcttat ccgctaccgg gaccacctca tctacacgta tacgggctcc 300  
 atcctggtgg ctgtgaacct ctaccagctg ctctccatct actcgccaga gcacatccgc 360  
 35



ES 2 704 677 T3

cagtatacca acaagaagat tggggagatg cccccccaca tctttgccat tgctgacaac 420  
 tgctacttca acatgaaacg caacagccga gaccagtgct gcatcatcag tggggaatct 480  
 ggggccggga agacggagag cacaaagctg atcctgcagt tcctggcagc catcagtggg 540  
 cagcactcgt ggattgagca gcaggtcttg gaggccacc ccatctgga agcatttggg 600  
 aatgccaaga ccatccgcaa tgacaactca agccgtttcg gaaagtacat cgacatccac 660  
 ttcaacaagc ggggcccatt cgagggcgcg aagattgagc agtacctgct ggaaaagtca 720  
 cgtgtctgtc gccaggccct ggatgaaag aactaccacg tgttctactg catgctggag 780  
 ggcatgagtg aggatcagaa gaagaagctg ggcttgggcc aggcctctga ctacaactac 840  
 ttggccatgg gtaactgcat aacctgtgag ggccgggtgg acagccagga gtacgccaac 900  
 atccgctccg ccatgaaggt gctcatgttc actgacaccg agaactggga gatctcgaag 960  
 ctctggctg ccatcctgca cctgggcaac ctgcagtatg aggcacgcac atttghaaac 1020  
 ctggatgcct gtgaggttct cttctcccca togctggcca cagctgcatc cctgcttgag 1080  
 gtgaaccccc cagacctgat gagctgcctg actagccgca ccctcatcac ccgcggggag 1140  
 acggtgtcca cccactgag caggaacag gcactggacg tgcgcgacgc ctctgtaaaag 1200  
 gggatctacg gggcgctgtt cgtgtggatt gtggacaaga tcaacgcagc aatttacaag 1260  
 cctccctccc aggatgtgaa gaactctcgc aggtccatcg gcctcctgga catctttggg 1320  
 tttgagaact ttgctgtgaa cagctttgag cagctctgca tcaacttcgc caatgagcac 1380  
 ctgcagcagt tctttgtgcg gcacgtgttc aagctggagc aggaggaata tgacctggag 1440  
 agcattgact gggtgcacat cgagttcact gacaaccagg atgccttggga catgattgcc 1500  
 aacaagccca tgaacatcat ctccctcatc gatgaggaga gcaagttccc caagggcaca 1560  
 gacaccacca tgttacacaa gctgaactcc cagcacaagc tcaacgcca ctacatcccc 1620  
 cccaagaaca accatgagac ccagtttggc atcaaccatt ttgcaggcat cgtctactat 1680  
 gagaccacaag gcttcctgga gaagaaccga gacaccctgc atggggacat tatccagctg 1740  
 gtccactcct ccaggaacaa gttcatcaag cagatcttcc aggccgatgt cgccatgggc 1800  
 gccgagacca ggaagcgctc gccacactt agcagccagt tcaagcggtc actggagctg 1860  
 ctgatgcgca cgctgggtgc ctgccagccc ttctttgtgc gatgcatcaa gcccaatgag 1920  
 ttcaagaagc ccatgctgtt cgaccggcac ctgtgcgtgc gccagctgcg gtactcagga 1980  
 atgatggaga ccatccgaat ccgccgagct ggctaccca tccgctacag ctctgtagag 2040  
 tttgtggagc ggtaccgtgt gctgctgcca ggtgtgaagc cggcctacaa gcagggcgac 2100  
 ctcccgggga cttgccagcg catggctgag gctgtgctgg gcaccacga tgactggcag 2160  
 ataggcaaaa ccaagatctt tctgaaggac caccatgaca tgctgctgga agtggagcgg 2220

ES 2 704 677 T3

gacaaagcca tcaccgacag agtcatcctc cttcagaaag tcatccgggg attcaaagac 2280  
 aggtctaact ttctgaagct gaagaacgct gccacactga tccagaggca ctggcgggggt 2340  
 cacaactgta ggaagaacta cgggctgatg cgtctgggct tcttgccgct gcaggccctg 2400  
 caccgctccc ggaagctgca ccagcagtac cgctggccc gccagcgcac catccagttc 2460  
 caggcccgct gccgccccta tctggtgctg aaggccttcc gccaccgct ctgggctgtg 2520  
 ctcaccgtgc aggcctatgc ccggggcatg atcgcccgca ggctgcacca acgcctcagg 2580  
 gctgagtatc tgtggcgcct cgaggctgag aaaatgcggc tggcggagga agagaagctt 2640  
 cggaaggaga tgagcgccaa gaaggccaag gaggaggccg agcgcaagca tcaggagcgc 2700  
 ctggcccagc tggctcgtga ggacgctgag cgggagctga aggagaagga ggccgctcgg 2760  
 cggaagaagg agctcctgga gcagatggaa agggcccggc atgagcctgt caatcactca 2820  
 gacatggtgg acaagatggt tggcttcctg gggacttcag gtggcctgcc aggccaggag 2880  
 ggccaggcac ctagtggctt tgaggacctg gagcgagggc ggagggagat ggtggaggag 2940  
 gacctggatg cagccctgcc cctgcctgac gaggatgagg aggacctctc tgagtataaa 3000  
 ttgccaagt tcgcgccac ctacttcag gggacaacta cgcactccta caccggcgg 3060  
 ccactcaaac agccactgct ctacatgac gacgaggtg accagctg 3108

<210> 23  
 <211> 4577  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> sintético

10

<400> 23  
 ctgctgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggctcg ggcgacctt 60  
 ggtcgccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggcaa ctccatcact 120  
 aggggttct ttagttaat gattaaccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180  
 aggaagatcc taatcgggaa ttcgcccta agctagcgtg ccacctggtc gacattgatt 240  
 attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga 300  
 gttccgcgtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcca acgacccccg 360  
 cccattgacg tcaataatga cgtatgtcc catagtaacg ccaataggga cttccattg 420  
 acgtcaatgg gtggactatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca 480  
 tatgccaaagt acgccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct ggcattatgc 540  
 ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc 600  
 tattaccatg ggtcgaggtg agccccacgt tctgcttcac tctcccac tccccccct 660  
 ccccaccccc aatthtgtat ttatthtatt tttaattatt ttgtgcagcg atggggcgg 720

ES 2 704 677 T3

gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg cggggcgagg 780  
 cggagagggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc ttttatggcg 840  
 aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcggc tgcagaagtt 900  
 ggtcgtgagg cactgggcag gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat 960  
 agaaactggg cttgtcgaga cagagaagac tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc 1020  
 ttactgacat ccactttgcc tttctctcca caggtgtcca ggcggccgcc atggtgattc 1080  
 ttcagcaggg ggaccatgtg tggatggacc tgagattggg gcaggagttc gacgtgcca 1140  
 tcgggggggt ggtgaagctc tgcgactctg ggcaggtcca ggtggtggat gatgaagaca 1200  
 atgaacactg gatctctccg cagaacgcaa cgcacatcaa gcctatgcac cccacgtcgg 1260  
 tccacggcgt ggaggacatg atccgcctgg gggacctcaa cgaggcgggc atcttgcgca 1320  
 acctgcttat ccgctaccgg gaccacctca tctacacgta tacgggctcc atcctggtgg 1380  
 ctgtgaaccc ctaccagctg ctctccatct actcgccaga gcacatccgc cagtatacca 1440  
 acaagaagat tggggagatg cccccccaca tctttgcat tgctgacaac tgctacttca 1500  
 acatgaaacg caacagccga gaccagtgtc gcatcatcag tggggaatct ggggccggga 1560  
 agacggagag cacaaagctg atcctgcagt tcctggcagc catcagtggg cagcactcgt 1620  
 ggattgagca gcaggtcttg gaggccacc ccattctgga agcatttggg aatgccaaga 1680  
 ccacccgcaa tgacaactca agccgtttcg gaaagtacat cgacatccac ttcaacaagc 1740  
 ggggcgccat cgagggcgcg aagattgagc agtacctgct ggaaaagtca cgtgtctgtc 1800  
 gccaggecct ggatgaaag aactaccacg tgttctactg catgctggag ggcattgagt 1860  
 aggatcagaa gaagaagctg ggcttgggcc aggcctctga ctacaactac ttggccatgg 1920  
 gtaactgcat aacctgtgag ggccgggtgg acagccagga gtacgccaac atccgctccg 1980  
 ccatgaaggt gctcatgttc actgacaccg agaactggga gatctcgaag ctcctggctg 2040  
 ccatcctgca cctgggcaac ctgcagtatg aggcacgcac atttgaaaac ctggatgcct 2100  
 gtgaggttct cttctcccca tcgctggcca cagctgcatc cctgcttgag gtgaaccccc 2160  
 cagacctgat gagctgcctg actagccgca ccctcatcac ccgcggggag acggtgtcca 2220  
 cccactgag caggaacag gcaactggacg tgcgcgacgc cttcgtaaag gggatctacg 2280  
 ggcggctggt cgtgtggatt gtggacaaga tcaacgcagc aatttacaag cctccctccc 2340  
 aggatgtgaa gaactctcgc aggtccatcg gcctcctgga catctttggg tttgagaact 2400  
 ttgctgtgaa cagctttgag cagctctgca tcaactctgc caatgagcac ctgcagcagt 2460  
 tctttgtgcg gcacgtgttc aagctggagc aggaggaata tgacctggag agcattgact 2520  
 ggctgcacat cgagttcact gacaaccag atgccctgga catgattgcc aacaagccca 2580

ES 2 704 677 T3

tgaacatcat ctccctcadc gatgaggaga gcaagttccc caagggcaca gacaccacca 2640  
 tgttacacaa gctgaactcc cagcacaagc tcaacgcaa ctacatcccc cccaagaaca 2700  
 accatgagac ccagtttggc atcaaccatt ttgcaggcat cgtctactat gagacccaag 2760  
 gcttctctgga gaagaaccga gacaccctgc atggggacat tatccagctg gtccactcct 2820  
 ccaggaacaa gttcatcaag cagatcttcc aggccgatgt cgccatgggc gccgagacca 2880  
 ggaagcgctc gcccacactt agcagccagt tcaagcggtc actggagctg ctgatgcgca 2940  
 cgetgggtgc ctgccagccc ttctttgtgc gatgcatcaa gcccaatgag tteaagaagc 3000  
 ccattgctgtt cgaccggcac ctgtgcgtgc gccagctgcy gtactcagga atgatggaga 3060  
 ccattccgaat ccgccgagct ggctaccccc tccgctacag cttcgtagag tttgtggagc 3120  
 ggtaccgtgt gctgctgcca ggtgtgaagc cggcctacaa gcagggcgac ctccgcggga 3180  
 cttgccagcy catggctgag gctgtgctgg gcaaccacga tgactggcag ataggcaaaa 3240  
 ccaagatctt tctgaaggac caccatgaca tgctgctgga agtggagcgg gacaaaagcca 3300  
 tcaccgacag agtcatctc cttcagaaag tcatccgggg attcaaagac aggtctaact 3360  
 ttctgaagct gaagaacgct gccacactga tccagaggca ctggcggggt cacaactgta 3420  
 ggaagaacta cgggctgatg cgtctgggct tctgcyggt gcagggcctg caccgctccc 3480  
 ggaagctgca ccagcagtac cgcctggccc gccagcgcct catccagtto caggcccgt 3540  
 gccgcgccta tctggtgcyg aaggccttcc gccaccgct ctgggctgtg ctaccctgc 3600  
 aggcctatgc ccggggcatg atcggccgca ggctgcacca acgcctcagg gctgagtatc 3660  
 tgtggcgcct cgaggtgag aaaatgcygc tggcggagga agagaagctt cgggaaggaga 3720  
 tgagcgccaa gaaggccaag gaggaggccg agcgcaagca tcaggagcgc ctggcccagc 3780  
 tggctcgtga ggacgtgag cgggagctga aggagaagga ggccgctcgg cggagaagag 3840  
 agctcctgga gcagatggaa agggcccgc atgagcctgt caatcactca gacatggtgg 3900  
 acaagatggt tggcttctc gggacttcag gtggcctgcc aggcagagag gccagggcac 3960  
 ctagtggctt tgaggacctg gagcgagggc ggagggagat ggtggaggag gacctggatg 4020  
 cagccctgcc cctgcctgac gaggatgagg aggacctctc tgagtataaa tttgccaagt 4080  
 tcgcyggccac ctacttccag gggacaacta cgcactccta caccgcyg ccaactcaaac 4140  
 agccactgct ctaccatgac gacgaggggtg accagctggt aagtatcaag gttacaagac 4200  
 aggtttaagg agaccaatag aaactgggct tgtcgagaca gagaagactc ttgcytttct 4260  
 gggattttgc cgatttcggc ctattggtta aaaaatgagc tgatttaaca aaaatttaac 4320  
 gcgaatttta acaaaaatatt aacgtttata atttcaggtg gcatctttcc aattgaaggg 4380  
 cgaattccga tcttctaga gcatggctac gtagataagt agcatggcgg gttaatcatt 4440  
 aactacaagg aaccctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgcct 4500  
 actgaggccg ggcgaccaa ggctcggcga cgcccgggct ttgcccgggc ggcctcagtg 4560  
 agcgagcgag cgcgcag 4577

- 5 <210> 24
- <211> 3540
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

10 <220>

ES 2 704 677 T3

<223> sintético

<400> 24

gcagccctgg	cggtctggat	caccatcctc	cgcttcatgg	gggacctccc	tgagcccaag	60
taccacacag	ccatgagtga	tggcagtgag	aagatccctg	tgatgaccaa	gatttatgag	120
accctgggca	agaagacgta	caagagggag	ctgcaggccc	tgagggcga	gggcgaggcc	180
cagctccccg	agggccagaa	gaagagcagt	gtgaggcaca	agctggtgca	tttgactctg	240
aaaaagaagt	ccaagctcac	agaggagtg	accaagaggc	tgatgacgg	ggagtccaca	300
gtgcagggca	acagcatgct	ggaggaccgg	cccacctcca	acctggagaa	gctgcacttc	360
atcatcgga	atggcatcct	goggccagca	ctccgggacg	agatctactg	ccagatcagc	420
aagcagctga	cccacaacct	ctccaagagc	agctatgccc	ggggctggat	tctcgtgtct	480
ctctgcgtgg	gctgtttcgc	cccctccgag	aagtttgtca	agtacctgcg	gaacttcatc	540
cacgggggcc	cgcccggcta	cgccccgtac	tgtgaggagc	gcctgagaag	gacctttgtc	600
aatgggacac	ggacacagcc	gcccagctgg	ctggagctgc	agggccacaa	gtccaagaag	660
ccaatcatgt	tgccogtgac	attcatggat	gggaccacca	agaccctgct	gacggactcg	720
gcaaccacgg	ccaaggagct	ctgcaacgcg	ctggccgaca	agatctctct	caaggaccgg	780
ttcgggttct	ccctctacat	tgccctgttt	gacaaggtgt	cctccctggg	cagcggcagt	840
gaccacgtca	tggacgccat	ctcccagtgc	gagcagtacg	ccaaggagca	gggcgcccag	900
gagcgcaacg	ccccctggag	gctcttcttc	cgcaaagagg	tcttcacgcc	ctggcacagc	960
ccctccgagg	acaacgtggc	caccaacctc	atctaccagc	aggtggtgcg	aggagtcaag	1020
tttggggagt	acaggtgtga	gaaggaggac	gacctggctg	agctggcctc	ccagcagtac	1080
tttgtagact	atggctctga	gatgatcctg	gagcgctcc	tgaacctcgt	gcccacctac	1140
atccccgacc	gcgagatcac	gcccctgaag	acgctggaga	agtgggcca	gctggccatc	1200
gccgcccaca	agaaggggat	ttatgccag	aggagaactg	atgccagaa	ggtcaaagag	1260
gatgtggtca	gttatgcccg	cttcaagtgg	cccttgctct	tctccaggtt	ttatgaagcc	1320
tacaaattct	caggccccag	tctcccgaag	aacgacgtca	tcgtagccgt	caactggacg	1380
5 ggtgtgtact	ttgtggatga	gcaggagcag	gtacttctgg	agctgtcctt	cccagagatc	1440

ES 2 704 677 T3

atggcctgt ccagcagcag ggagtgcctg gtctggctct cactgggctg ctctgatctt 1500  
ggctgtgctg cgcctcactc aggctgggca ggactgacct cggcggggcc ctgttctccg 1560  
tgttggtcct gcaggggagc gaaaacgacg gccccagct tcacgctggc caccatcaag 1620  
ggggacgaat acaccttcac ctccagtaat gctgaggaca ttcgtgacct ggtggtcacc 1680  
ttcctagagg ggctccggaa gagatctaag tatgtttgtg ccctgcagga taaccccaac 1740  
cccgcaggcg aggagtccag cttcctcagc ttgccaagg gagacctcat catcctggac 1800  
catgacacgg gcgagcaggt catgaaactc ggctgggcca acggcatcaa tgagaggacc 1860  
aagcagcgtg gggacttccc caccgactgt gtgtacgtca tgcccactgt caccatgcca 1920  
cctcgtgaga ttgtggccct ggtcaccatg actcccgatc agaggcagga cgttgtccgg 1980  
ctcttgacgc tgcgaacggc ggagcccagc gtgctgcca agccctacac gctggaggag 2040  
tttctctatg actacttcag gccccacc cagcacacgc tgagccgtgt catggtgtcc 2100  
aaggcccagc gcaaggaccg gctgtggagc cacacgcggg aaccgctcaa gcaggcgtg 2160  
ctcaagaagc tcctgggagc tgaggagctc tcgagaggag cctgcctggc cttcattgct 2220  
gtgctcaagt acatgggcca ctaccctgcc aagaggacac gctccgtcaa tgagctcacc 2280  
gaccagatct ttgagggtcc cctgaaagcc gagcccctga aggacgaggc atatgtgagc 2340  
atcctgaagc agctgaccga caaccacatc aggtacagcg aggagcgggg ttgggagctg 2400  
ctctggctgt gcacgggctc tttcccacc agcaacatcc tcctgcccc cgtgcagcgc 2460  
ttcctgcagt cccgaaagca ctgcccactc gccatcgact gcctgcaacg gctccagaaa 2520  
gcctgagaa acgggtcccg gaagtacctc ccgacactgg tggagggtgga ggccatccag 2580  
cacaagacca cccagatctt ccacaaggtc tacttccctg atgacactga cgaggccttc 2640  
gaagtggagt ccagacacaa ggccaaggac ttctgccaga acatgccac caggctgctc 2700  
ctcaagtcct cagagggatt cagcctcttt gtcaaaattg cagacaaggc catcagcgtt 2760  
cctgagaatg acttcttctt tgactttggt cgacacttga cagactggat aaagaaagct 2820  
cggcccatca aggacggaat tgtgccctca ctacactacc aggtgttctt catgaagaag 2880  
ctgtggacca ccacggtgcc agggaaggat cccatggccg attccatctt cactattac 2940  
caggagttgc ccaagtatct ccgaggctac cacaagtgca cgcgggagga ggtgctgagc 3000  
ctgggggagc tgatctacag ggtcaagttc gaggaggaca agtctactt cccagcactc 3060  
cccaagctgc tgcgggagct ggtgcccagc gacctatcc ggcaggcttc acctgatgac 3120  
tggaagcggc ccatcgtcgc ctacttcaac aagcacgagc ggaagtcaa ggaggaggcc 3180  
aagctggcct tcctgaagct catcttcaag tggcccacct ttggctcagc cttcttcgag 3240  
gtgaagcaaa ctacggagcc aaacttccct gagatcctcc taattgccat caacaagtat 3300  
ggggtcagcc tcatcgatcc caaacgaag gatatcctca cactcatcc cttaccaag 3360  
atctccaact ggagcagcgc caacacctac ttccacatca ccattgggaa cttggtgagc 3420  
gggagcaaac tgctctgca gacgtcactg ggctacaaga tggatgacct cctgacttcc 3480  
tacattagcc agatgctcac agccatgagc aaacagcggg gctccaggag cggcaagtga 3540

- 5 <210> 25
- <211> 215
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

ES 2 704 677 T3

	<220>		
	<223> sintético		
5	<400> 25		
	gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc	60	
	ttgacctgg aaggtgccac tccactgtc ctttcctaat aaaatgagga aattgcatcg	120	
	cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg	180	
	gaggattggg aagacaatag caggcatgct gggga	215	
10	<210> 26		
	<211> 4389		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
15	<220>		
	<223> sintético		
	<400> 26		
	ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgacctt	60	
	ggtcgccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact	120	
	aggggttct thtagttaat gattaaccgc ccatgctact tatctacgta gccatgctct	180	
	aggaagatcg gaattcgccc tttgatcagg gattttgccg atttcggcct attggttaa	240	
	aatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattttaac aaaatattaa cgtttataat	300	
	ttcaggtggc atctttcgat aggcacctat tggcttact gacatccact ttgcctttct	360	
	ctccacaggc agccctggcg gtctggatca ccatcctccg cttcatgggg gacctccctg	420	
	agcccaagta ccacacagcc atgagtgatg gcagtgagaa gatccctgtg atgaccaaga	480	
	tttatgagac cctgggcaag aagacgtaca agaggagct gcaggccctg cagggcgagg	540	
	gcgaggcca gctccccgag ggccagaaga agagcagtgt gaggcacaag ctggtgcatt	600	
	tgactctgaa aaagaagtcc aagctcacag aggaggtgac caagaggctg catgacgggg	660	
	agtccacagt gcagggcaac agcatgctgg aggaccggcc cacctccaac ctggagaagc	720	
	tgacttcat catcggcaat ggcacctgc ggccagcact ccgggacgag atctactgcc	780	
20	agatcagcaa gcagctgacc cacaaccct ccaagagcag ctatgcccg ggctggattc	840	

ES 2 704 677 T3

tcgtgtctct ctgctgggc tgtttcgccc cctccgagaa gtttgtcaag tacctgcgga 900  
 acttcatcca cgggggcccc cccggctacg ccccgactg tgaggagcgc ctgagaagga 960  
 cctttgtcaa tgggacacgg acacagccgc ccagctggct ggagctgcag gccaccaagt 1020  
 ccaagaagcc aatcatggtt cccgtgacat tcatggatgg gaccaccaag accctgctga 1080  
 cggactcggc aaccacggcc aaggagctct gcaacgcgct ggccgacaag atctctctca 1140  
 aggaccggtt cgggttctcc ctctacattg ccctgtttga caagggttcc tccctgggca 1200  
 gcggcagtga ccacgtcatg gacgceatct cccagtgcga gcagtacgcc aaggagcagg 1260  
 gcgcccagga gcgcaacgcc ccctggaggc tcttcttccg caaagaggtc ttcacgccct 1320  
 ggcacagccc ctccaggagc aacgtggcca ccaacctcat ctaccagcag gtggtgcgag 1380  
 gagtcaagtt tggggagtac aggtgtgaga aggaggacga cctggctgag ctggcctccc 1440  
 agcagtactt tgtagactat ggctctgaga tgatcctgga gcgcctcctg aacctcgtgc 1500  
 ccacctacat ccccgaccgc gagatcacgc ccctgaagac gctggagaag tgggcccagc 1560  
 tggccatcgc cgcccacaag aaggggattt atgccagag gagaactgat gcccagaagg 1620  
 tcaaagagga tgtggtcagt tatgcccgtt tcaagtggcc ctgctcttc tccaggtttt 1680  
 atgaagccta caaattctca ggccccagtc tccccaaaga cgacgtcatc gtggccgtca 1740  
 actggacggg tgtgtacttt gtggatgagc aggagcaggt acttctggag ctgtccttcc 1800  
 cagagatcat ggccgtgtcc agcagcaggg agtgccgtgt ctggctctca ctgggctgct 1860  
 ctgatcttgg ctgtgctgcg cctcactcag gctgggcagg actgaccccg gcggggccct 1920  
 gttctccgtg ttggtcctgc aggggagcga aaacgacggc cccagcttc acgtggcca 1980  
 ccatcaaggg ggacgaatac accttcacct ccagtaatgc tgaggacatt cgtgacctgg 2040  
 tggtcacctt cctagagggg ctccggaaga gatctaagta tgttgtggcc ctgcaggata 2100  
 accccaacc cgcaggcgag gagtcaaggct tcctcagctt tgccaagggg gacctcatca 2160  
 tcctggacca tgacacgggc gagcaggtca tgaactcggg ctgggccaac ggcataatg 2220  
 agaggaccaa gcagcgtggg gacttcccc cccgactgtgt gtacgtcatg cccactgtca 2280  
 ccatgccacc tcgtgagatt gtggccctgg tcacatgac tcccgatcag aggcaggacg 2340  
 ttgtccggct cttgcagctg cgaacggcgg agcccaggt gcgtgccaa ccctacacgc 2400  
 tggaggagtt ttcctatgac tacttcaggc cccacccaa gcacacgctg agccgtgtca 2460  
 tgggtgccaa ggcccagggc aaggaccggc tgtggagcca cacgcgggaa ccgctcaagc 2520  
 aggcgctgct caagaagctc ctgggcagtg aggagctctc gcaggaggcc tgctggcct 2580  
 tcattgctgt gctcaagtac atgggcgact acccgtccaa gaggacacgc tccgtcaatg 2640  
 agtcaccga ccagatcttt gagggctccc tgaaagccga gccctgaag gacgaggcat 2700  
 atgtgcagat cctgaagcag ctgaccgaca accacatcag gtacagcgag gagcggggtt 2760



ES 2 704 677 T3

gggagctgct ctggctgtgc acgggccttt tcccaccag caacatcctc ctgccccacg 2820  
 tgcagcgctt cctgcagtcc cgaaagcact gcccaactcgc catcgactgc ctgcaacggc 2880  
 tccagaaagc cctgagaaac ggggtcccga agtaccctcc gcacctggtg gaggtggagg 2940  
 ccatccagca caagaccacc cagattttcc acaaggctca cttccctgat gacactgacg 3000  
 aggccttcga agtggagtcc agcaccaagg ccaaggactt ctgccagaac atcgccacca 3060  
 ggctgctcct caagtccctca gagggattca gcctctttgt caaaattgca gacaaggta 3120  
 tcagcgttcc tgagaatgac ttcttctttg actttgttcg acaacttgaca gactggataa 3180  
 agaaaagctcg gcccatcaag gacggaattg tgccctcact cacctaccag gtgttcttca 3240  
 tgaagaagct gtggaccacc acgggtgccag ggaaggatcc catggccgat tccatcttcc 3300  
 actattacca ggagttgcc aagtatctcc gaggtacca caagtgcacg cgggaggagg 3360  
 tgctgcagct gggggcgctg atctacaggg tcaagttcga ggaggacaag tcctacttcc 3420  
 ccagcatccc caagctgctg cgggagctgg tgccccagga ccttatccgg caggtctcac 3480  
 ctgatgactg gaagcgggtcc atcgtcgcct acttcaacaa gcacgcaggg aagtccaagg 3540  
 aggaggccaa gctggccttc ctgaagctca tcttcaagtg gcccaccttt ggctcagcct 3600  
 tcttcgaggt gaagcaaaact acggagccaa acttccctga gatcctccta attgccatca 3660  
 acaagtatgg ggtcagcctc atcgatccca aaacgaagga tatcctcacc actcatcctc 3720  
 tcaccaagat ctccaactgg agcagcggca acacctactt ccacatcacc attgggaact 3780  
 tgggtgcgcg gagcaaaact ctctgcgaga cgtcactggg ctacaagatg gatgacctcc 3840  
 tgacttccta cattagccag atgctcacag ccatgagcaa acagcggggc tccaggagcg 3900  
 gcaagtgacc gcggcctgct gccggctctg cggcctcttc cgcgtcttcg agatctgcct 3960  
 cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgcc ctccccctg ccttccttga 4020  
 ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt 4080  
 gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtgg gcaggacagc aagggggagg 4140  
 attggaaga caatagcagg catgctgggg actcgagtta agggcgcaat tcccgattag 4200  
 gatcttccta gagcatggct acgtagataa gtagcatggc gggttaatca ttaactaaa 4260  
 ggaacccta gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgtcgc tcactgaggg 4320  
 cgggcgacca aaggtcggcc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg 4380  
 agcgcgcag 4389

<210> 27  
 <211> 4468  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> sintético

10

<400> 27

ES 2 704 677 T3

ctgcgcgctc gctcgcctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctc ggcgaccttt 60  
 ggtcgcccg gctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120  
 aggggttctt tctagttaat gattaacccg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180  
 aggaagatcc taatcgggaa ttcgccctta agctagcgtg ccacctggtc gacattgatt 240  
 attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga 300  
 gttccgcggtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgcca acgacccccg 360  
 cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg 420  
 acgtcaatgg gtggactatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca 480  
 tatgccaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct ggcattatgc 540  
 ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc 600  
 tattaccatg ggtcgagggt agccccacgt tctgtttcac tctccccatc tccccccct 660  
 ccccaccccc aattttgtat ttatttatth tttaattatt ttgtgcagcg atggggcgcg 720  
 gggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcgggggc agggggcgggg cggggcgagg 780  
 cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc ttttatggcg 840  
 aggcggcgcc ggcggcgccc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcggggcgcc tgcagaagtt 900  
 ggtcgtgagg cactgggcag gtaagtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat 960  
 agaaactggg ctgtgcgaga cagagaagac tcttgcgttt ctgataggca cctattggtc 1020  
 ttactgacat ccactttgcc tttctctcca caggtgtcca ggcggccgcc atggtgattc 1080  
 ttcagcaggg ggaccatgtg tggatggacc tgagattggg gcaggagttc gacgtgcca 1140  
 tcggggcggt ggtgaagctc tgccactctg ggcaggtcca ggtggtggat gatgaagaca 1200  
 atgaacactg gatctctccg cagaacgcaa cgcacatcaa gcctatgac cccacgtcgg 1260  
 tccacggcgt ggaggacatg atccgcctgg gggacctcaa cgaggcgggc atcttgcgca 1320  
 acctgcttat ccgctaccgg gaccacctca tctacacgta tacgggctcc atcctggtgg 1380  
 ctgtgaacct ctaccagctg ctctccatct actcgcaga gcacatccgc cagtatacca 1440  
 acaagaagat tggggagatg cccccaca tctttgccat tgctgacaac tgctacttca 1500  
 acatgaaacg caacagccga gaccagtgtc gcatcatcag tggggaatct ggggccggga 1560  
 agacggagag cacaagctg atcctgcagt tcttggcagc catcagtggg cagcactcgt 1620  
 ggattgagca gcaggctctg gaggccacct ccattctgga agcatttggg aatgccaaga 1680  
 ccatccgcaa tgacaactca agccgtttcg gaaagtacat cgacatccac ttcaacaagc 1740  
 ggggcgccat cgaggcgcg aagattgagc agtacctgct ggaaaagtca cgtgtctgtc 1800

ES 2 704 677 T3

gccagccct ggatgaaagg aactaccacg tgttctactg catgctggag ggcatgagtg 1860  
 aggatcagaa gaagaagctg ggcttgggcc aggcctctga ctacaactac ttggccatgg 1920  
 gtaactgcat aacctgtgag ggccgggtgg acagccagga gtacgccaac atccgctccg 1980  
 ccatgaaggt gctcatgttc actgacaccg agaactggga gatctcgaag ctcctggctg 2040  
 ccatcctgca cctgggcaac ctgcagtatg aggcacgcac atttgaaaac ctggatgcct 2100  
 gtgaggttct cttctcccca tcgtggcca cagctgcac cctgcttgag gtgaaccccc 2160  
 cagacctgat gagctgcctg actagccgca ccctcatcac ccgcggggag acgggtgtcca 2220  
 cccactgag caggaacag gcaactggac tgcgcgacgc cttcgtaaag gggatctacg 2280  
 ggcggctggt cgtgtggatt gtggacaaga tcaacgcagc aatttacaag cctccctccc 2340  
 aggatgtgaa gaactctcgc aggtccatcg gcctcctgga catctttggg tttgagaact 2400  
 ttgctgtgaa cagctttgag cagctctgca tcaacttcgc caatgagcac ctgcagcagt 2460  
 tctttgtgcg gcacgtgttc aagctggagc agggaggaata tgacctggag agcattgact 2520  
 ggctgcacat cgagttcact gacaaccagg atgccctgga catgattgcc aacaagccca 2580  
 tgaacatcat ctccctcatc gatgaggaga gcaagttccc caagggcaca gacaccacca 2640  
 tgttacacaa gctgaactcc cagcacaagc tcaacgccaa ctacatcccc cccaagaaca 2700  
 accatgagac ccagtttggc atcaaccatt ttgcaggcat cgtctactat gagaccaag 2760  
 gcttcctgga gaagaaccga gacaccctgc atggggacat tatccagctg gtccactcct 2820  
 ccaggaacaa gttcatcaag cagatcttcc aggccgatgt cggcatgggc gccgagacca 2880  
 ggaagcgcct gccacactt agcagccagt tcaagcggtc actggagctg ctgatgcgca 2940  
 cgctgggtgc ctgccagccc ttctttgtgc gatgcatcaa gcccaatgag ttcaagaagc 3000  
 ccatgctggt cgaccggcac ctgtgcgtgc gccagctgcg gtactcagga atgatggaga 3060  
 ccatccgaat ccgccgagct ggctaccca tccgctacag cttcgtagag tttgtggagc 3120  
 ggtaccgtgt gctgctgcca ggtgtgaagc cggcctacaa gcagggcgac ctccgcggga 3180  
 cttgccagcg catggctgag gctgtgctgg gcacccacga tgactggcag ataggcaaaa 3240  
 ccaagatctt tctgaaggac caccatgaca tgctgctgga agtggagcgg gacaaaacca 3300  
 tcaccgacag agtcatctc cttcagaaag tcatccgggg attcaaagac aggtctaact 3360  
 ttctgaagct gaagaacgct gccacactga tccagaggca ctggcggggc cacaactgta 3420  
 ggaagaacta cgggctgatg cgtctgggct tcctgcggct gcagggcctg caccgctccc 3480  
 ggaagctgca ccagcagtac cgctggccc gccagcgcat catccagttc caggcccgct 3540  
 gccgcgcta tctggtgcgc aaggccttcc gccaccgct ctgggctgtg ctcaccgtgc 3600  
 aggcctatgc ccggggcatg atcggccgca ggctgcacca acgcctcagg gctgagtatc 3660

ES 2 704 677 T3

tgtggcgctt cgaggctgag aaaatgcggc tggcggagga agagaagctt cggaaggaga 3720  
 tgagcgccaa gaaggccaag gaggaggccg agcgcaagca tcaggagcgc ctggcccagc 3780  
 tggctcgtga ggacgctgag cgggagctga aggagaagga ggccgctcgg cggaagaagg 3840  
 agctcctgga gcagatgaa agggcccgcc atgagcctgt caatcactca gacatggtgg 3900  
 acaagatggt tggcttcctg gggacttcag gtggcctgcc aggccaggag ggccaggcac 3960  
 ctagtggctt tgaggacctg gagcgagggc ggagggagat ggtggaggag gacctggatg 4020  
 cagccctgcc cctgcctgac gaggatgagg aggacctctc tgagtataaa tttgccaagt 4080  
 tcgcgccac ctacttcag gggacaacta cgcactocta caccggcgg cactcaaac 4140  
 agccactgct ctacatgac gacgagggtg accagctggt aagtatcaag gttacaagac 4200  
 aggtttaagg agaccaatag aaactgggct tgtcgagaca gagaagactc ttgctttct 4260  
 caattgaagg gcgaattccg atcttcctag agcatggcta cgtagataag tagcatggcg 4320  
 ggttaatcat taactacaag gaaccctag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg 4380  
 ctcgctcgt cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg 4440  
 cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcag 4468

<210> 28  
 <211> 4268  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> sintético

10

<400> 28  
 ctgcgcgctc gctcgcctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgtcg ggcgaccttt 60  
 ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggccaa ctccatcact 120  
 aggggttctt ttagttaaag gattaaccgg ccatgctact tatctacgta gccatgctct 180  
 aggaagatcg gaattcgata ggcacctatt ggtcttactg acatccactt tgcctttctc 240  
 tccacaggca gccctggcgg tctggatcac catcctccgc ttcattggggg acctccctga 300  
 gcccaagtac cacacagcca tgagtgatgg cagtgagaag atccctgtga tgaccaagat 360  
 ttatgagacc ctgggcaaga agacgtacaa gagggagctg caggccctgc agggcgaggg 420  
 cgaggcccag ctccccgagg gccagaagaa gagcagtggt aggcacaagc tgggtgcattt 480  
 gactctgaaa aagaagtcca agctcacaga ggaggtgacc aagaggctgc atgacgggga 540  
 gtccacagtg cagggcaaca gcatgctgga ggaccggccc acctccaacc tggagaagct 600  
 gcacttcact atcggcaatg gcatcctcgc gccagcactc cgggacgaga tctactgccca 660  
 gatcagcaag cagctgacct acaaccctc caagagcagc tatgcccggg gctgattct 720  
 cgtgtctctc tgcgtgggct gtttcgcccc ctccgagaag tttgtcaagt acctgcggaa 780

ES 2 704 677 T3

cttcatccac	gggggcccgc	ccggtacgc	cccgtactgt	gaggagcgcc	tgagaaggac	840
ctttgtcaat	gggacacgga	cacagccgcc	cagctggctg	gagctgcagg	ccaccaagtc	900
caagaagcca	atcatgttgc	ccgtgacatt	catggatggg	accaccaaga	ccctgctgac	960
ggactcggca	accacggcca	aggagctctg	caacgcgctg	gccgacaaga	tctctctcaa	1020
ggaccggttc	gggttctccc	tctacattgc	cctgtttgac	aaggtgtcct	ccctgggcag	1080
cggcagtgc	cacgtcatgg	acgccatctc	ccagtgcgag	cagtacgcc	aggagcaggg	1140
cggccaggag	cgcaacgccc	cctggaggct	cttcttccgc	aaagaggtct	tcacgccctg	1200
gcacagcccc	tcogaggaca	acgtggccac	caacctcatc	taccagcagg	tggtgcgagg	1260
agtcaagttt	ggggagtaca	ggtgtgagaa	ggaggacgac	ctggctgagc	tggcctccca	1320
gcagtacttt	gtagactatg	gctctgagat	gatcctggag	cgctctctga	acctcgtgcc	1380
cacctacatc	cccgaccgcg	agatcacgcc	cctgaagacg	ctggagaagt	gggccagct	1440
ggccatgcc	gccacaaga	aggggattta	tgcccagagg	agaactgatg	cccagaaggt	1500
caaagaggat	gtggtcagtt	atgcccgtt	caagtggccc	ttgctcttct	ccaggtttta	1560
tgaagcctac	aaattctcag	gccccagtct	ccccaaaac	gacgtcatcg	tggccgtcaa	1620
ctggacgggt	gtgtactttg	tgatgagca	ggagcaggt	cttctggagc	tgctcctccc	1680
agagatcatg	gccgtgtcca	gcagcaggg	gtgccgtgtc	tggtctctac	tggtctgtc	1740
tgatcttggc	tgtgtctg	ctcactcagg	ctgggcagga	ctgaccccgg	cggggccctg	1800
ttctccgtgt	tggtcctgca	gggagcgaa	aacgacggcc	cccagcttca	cgctggccac	1860
catcaagggg	gacgaataca	ccttcacctc	cagtaatgct	gaggacatte	gtgacctggt	1920
ggtcaccttc	ctagaggggc	tccggaagag	atctaagtat	gttgtggccc	tgacaggataa	1980
ccccaaaccc	gcagggcagg	agtcaggctt	cctcagcttt	gccaagggag	acctcatcat	2040
cctggacat	gacacggg	agcaggctcat	gaactcgggc	tggccaacg	gcatcaatga	2100
gaggaccaag	cagcgtggg	acttccccac	cgactgtgtg	tacgtcatgc	ccactgtcac	2160
catgccacct	cgtgagattg	tggccctggt	caccatgact	cccgatcaga	ggcaggacgt	2220
tgtccggctc	ttgcagctgc	gaacggcgga	gcccaggtg	cgtgccaagc	cctacacgct	2280
ggaggagttt	tctatgact	acttcaggcc	cccaccaag	cacacgctga	gccgtgtcat	2340
ggtgtccaag	gcccgaggca	aggaccggct	gtggagccac	acgcgggaac	cgctcaagca	2400
ggcgtgctc	aagaagctcc	tgggcagtga	ggagctctcg	caggaggcct	gcctggcctt	2460
cattgctgtg	ctcaagtaca	tgggcgacta	cccgtccaag	aggacacgct	ccgtcaatga	2520
gctcacggac	cagatctttg	aggtcccct	gaaagccgag	cccctgaagg	acgaggcata	2580
tgtgcagatc	ctgaagcagc	tgaccgacaa	ccacatcagg	tacagcgagg	agcggggtt	2640

ES 2 704 677 T3

ggagctgctc tggctgtgca cgggcctttt cccaccacgc aacatcctcc tgccccacgt 2700  
 gcagcgcttc ctgcagtccc gaaagcactg cccactcgcc atcgactgcc tgcaacggct 2760  
 ccagaaagcc ctgagaaacg ggtcccggaa gtaccctccg cacctgggtg aggtggaggc 2820  
 catccagcac aagaccaccc agattttcca caaggtctac ttccctgatg aactgacga 2880  
 ggccttcgaa gtggagtcca gcaccaaggc caaggacttc tgccagaaca tcgccaccag 2940  
 gctgctcctc aagtcctcag agggattcag cctctttgtc aaaattgcag acaaggatcat 3000  
 cagcgcttct gagaatgact tcttctttga ctttgttga cacttgacag actggataaa 3060  
 gaaagctcgg cccatcaagg acggaattgt gccctcactc acctaccagg tgttcttcat 3120  
 gaagaagctg tggaccacca cggtgccagg gaaggatccc atggccgatt ccatcttcca 3180  
 ctattaccag gagttgccca agtatctccg aggctaccac aagtgcacgc gggaggaggt 3240  
 gctgcagctg gggcgctga tctacagggt caagttcgag gaggacaagt cctacttccc 3300  
 cagcatcccc aagctgctgc gggagctggt gccccaggac cttatccggc aggtctcacc 3360  
 tgatgactgg aagcgggtcca tcgtcgccta cttcaacaag cacgcagggga agtccaagga 3420  
 ggaggccaag ctggccttcc tgaagctcat cttcaagtgg cccacctttg gctcagcctt 3480  
 cttcgaggtg aagcaaaacta cggagccaaa cttccctgag atcctcctaa ttgccatcaa 3540  
 caagtatggg gtcagcctca tcgatcccaa aacgaaggat atcctcacca ctcatccctt 3600  
 caccaagatc tccaactgga gcagcggcaa cacctacttc cacatcacca ttgggaactt 3660  
 ggtgcgcggg agcaaaactgc tctgcgagac gtcactgggc tacaagatgg atgacctcct 3720  
 gacttcctac attagccaga tgctcacagc catgagcaaa cagcggggct ccaggagcgg 3780  
 caagtgaccg cggcctgctg ccggctctgc ggcctcttcc gcgtcttga gatctgcctc 3840  
 gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tccccctgct cttccttgac 3900  
 cctggaaggt gccactccca ctgtccttcc ctaataaaat gaggaaattg catcgcattg 3960  
 tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga 4020  
 ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga ctcgagttaa gggcgcaatt cccgattagg 4080  
 atcttcctag agcatggcta cgtagataag tagcatggcg ggttaatcat taactacaag 4140  
 gaacccttag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg ctcgctcgct cactgaggcc 4200  
 gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga 4260  
 gcgcgcag 4268

<210> 29  
 <211> 278  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> sintético

10

<400> 29

# ES 2 704 677 T3

	gtgatcctag gtggaggccg aaagtacatg tttcgcacgg gaaccccaga ccctgagtac	60
	ccagatgact acagccaagg tgggaccagg ctggacggga agaactctggt gcaggaatgg	120
	ctggcgaagc gccaggggtc ccggtacgtg tggaaaccgca ctgagctcat gcaggcttcc	180
	ctggaccogt ctgtgaccga tctcatgggt ctctttgagc ctggagacat gaaatacgag	240
	atccaccgag actccacact ggaccctcc ctgatgga	278
	<210> 30	
	<211> 66	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sintético	
10	<400> 30	
	gactacaaag accatgacgg tgattataaa gatcatgaca tcgactacaa ggatgacgat	60
	gacaag	66
15	<210> 31	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> sintético	
	<400> 31	
25	atgtatgat ttctgatta tgctagcctc	30

**REIVINDICACIONES**

1.- Un sistema de construcción dual para expresar la secuencia codificadora de un gen de interés en una célula hospedante, y dicha secuencia codificadora consiste en una porción del extremo 5' y una porción del extremo 3', y dicho sistema de construcción dual comprende:

- 5 a) un primer plásmido que comprende, en la dirección 5'-3':
- una secuencia de repetición terminal invertida 5' (5'-ITR) de AAV;
  - una secuencia de promotor;
  - la porción del extremo 5' de dicha secuencia codificadora, y dicha porción del extremo 5' está unida operablemente a dicho promotor y está bajo su control;
- 10 - una secuencia de ácido nucleico de una señal donante de ruptura; y
- una secuencia de repetición terminal invertida 3' (3'-ITR) de AAV; y
- b) un segundo plásmido que comprende, en la dirección 5'-3':
- una secuencia de repetición terminal invertida 5' (5'-ITR) de AAV;
  - una secuencia de ácido nucleico de una señal aceptora de ruptura;
- 15 - el extremo 3' de dicha secuencia codificadora;
- una secuencia de ácido nucleico de señal de poliadenilación; y
  - una secuencia de repetición terminal invertida 3' (3'-ITR) de AAV,

en el que dicho primer plásmido comprende además una secuencia de ácido nucleico de una región recombinogénica en la posición 5' del 3'-ITR de AAV de dicho primer plásmido y en la posición 3' de la secuencia de ácido nucleico de la señal donante de ruptura, y en el que dicho segundo plásmido comprende además la secuencia de ácido nucleico de la región recombinogénica en la posición 3' del 5'-ITR de AAV de dicho segundo plásmido y en la posición 5' de la secuencia de ácido nucleico de la señal aceptora de ruptura, en el que la región recombinogénica es una región recombinogénica del fago F1 que consiste en la secuencia:

25 GGGATTTTGGCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAA  
T (SEQ ID NO:3), o uno de sus fragmentos que mantiene la propiedad recombinogénica de SEQ ID NO:3,

en el que, tras la introducción de dicho primer plásmido y dicho segundo plásmido en la célula hospedante, dicha secuencia codificadora se reconstituye por medio de las señales donante de ruptura y aceptora de ruptura.

30 2.- El sistema de construcción dual según la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos de las ITR se deriva del mismo serotipo de AAV o de serotipos diferentes de AAV, preferiblemente la 3'-ITR del primer plásmido y la 5'-ITR del segundo plásmido proceden del mismo serotipo de AAV, preferiblemente la 5'-ITR y la 3'-ITR del primer plásmido y la 5'-ITR y la 3'-ITR del segundo plásmido proceden, respectivamente, de diferentes serotipos de AAV, preferiblemente la 5'-ITR del primer plásmido y la 3'-ITR del segundo plásmido proceden de diferentes serotipos de AAV.

35 3.- El sistema de construcción dual según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la secuencia de ácido nucleico de la señal donante de ruptura consiste en la secuencia:

GTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTT  
GCGTTTCT (SEQ ID NO.1) y/o en el que la secuencia de ácido nucleico de la señal aceptora de ruptura consiste en la secuencia:

GATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAG (SEQ ID NO:2).

40 4.- El sistema de construcción dual según una cualquiera de las reivindicaciones previas, en el que la secuencia codificadora es una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína capaz de corregir una degeneración retiniana heredada.

5.- El sistema de construcción dual según la reivindicación 4, en el que la secuencia codificadora se selecciona del grupo que consiste en: ABCA4, MYO7A, CEP290, CDH23, EYS, USH2a, GPR98 o ALMS1.

45 6.- Un sistema de vector vírico de virus adenoasociado (AAV) dual, que comprende:

a) un primer vector vírico de AAV que contiene el primer plásmido según se define en una cualquiera de las



reivindicaciones 1 a 5, y

b) un segundo vector vírico de AAV que contiene el segundo plásmido según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

5 7.- El sistema de vector vírico de AAV dual según la reivindicación 6, en el que los vectores de virus adenoasociado (AAV) se seleccionan del mismo serotipo de AAV o de serotipos diferentes de AAV, preferiblemente el virus adenoasociado se selecciona del serotipo 2, el serotipo 8, el serotipo 5, el serotipo 7 o el serotipo 9.

8.- Una célula hospedante que comprende el sistema de vector vírico dual según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7.

10 9.- El sistema de construcción dual según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el sistema de vector vírico dual según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, o la célula hospedante según la reivindicación 8, para un uso médico, preferiblemente para un uso en terapia génica.

15 10.- El sistema de construcción dual, el sistema de vector vírico dual, la célula hospedante según la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de una patología o una enfermedad caracterizada por una degeneración retiniana, preferiblemente la degeneración retiniana es heredada, preferiblemente la patología o la enfermedad se selecciona del grupo que consiste en: retinitis pigmentosa, amaurosis congénita de Leber (LCA), enfermedad de Stargardt, enfermedad de Usher, síndrome de Alstrom, una enfermedad provocada por una mutación en el gen *ABCA4*.

20 11.- Una composición farmacéutica que comprende el sistema de construcción dual según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el sistema de vector vírico dual según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, o la célula hospedante según la reivindicación 8, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12.- Un ácido nucleico que consiste en SEQ ID NO:3, o uno de sus fragmentos, que mantiene la propiedad recombinogénica de SEQ ID NO:3 para su uso como región recombinogénica.

13.- Un método *in vitro* para inducir la recombinación genética, que comprende usar la secuencia que consiste en SEQ ID NO:3, o uno de sus fragmentos, que mantiene la propiedad recombinogénica de SEQ ID NO:3.

25 14.- La secuencia que consiste en SEQ ID NO:3, o uno de sus fragmentos, que mantiene la propiedad recombinogénica de SEQ ID NO:3 para su uso en un método de tratamiento, preferiblemente mediante terapia génica, en la que el método induce la recombinación genética.

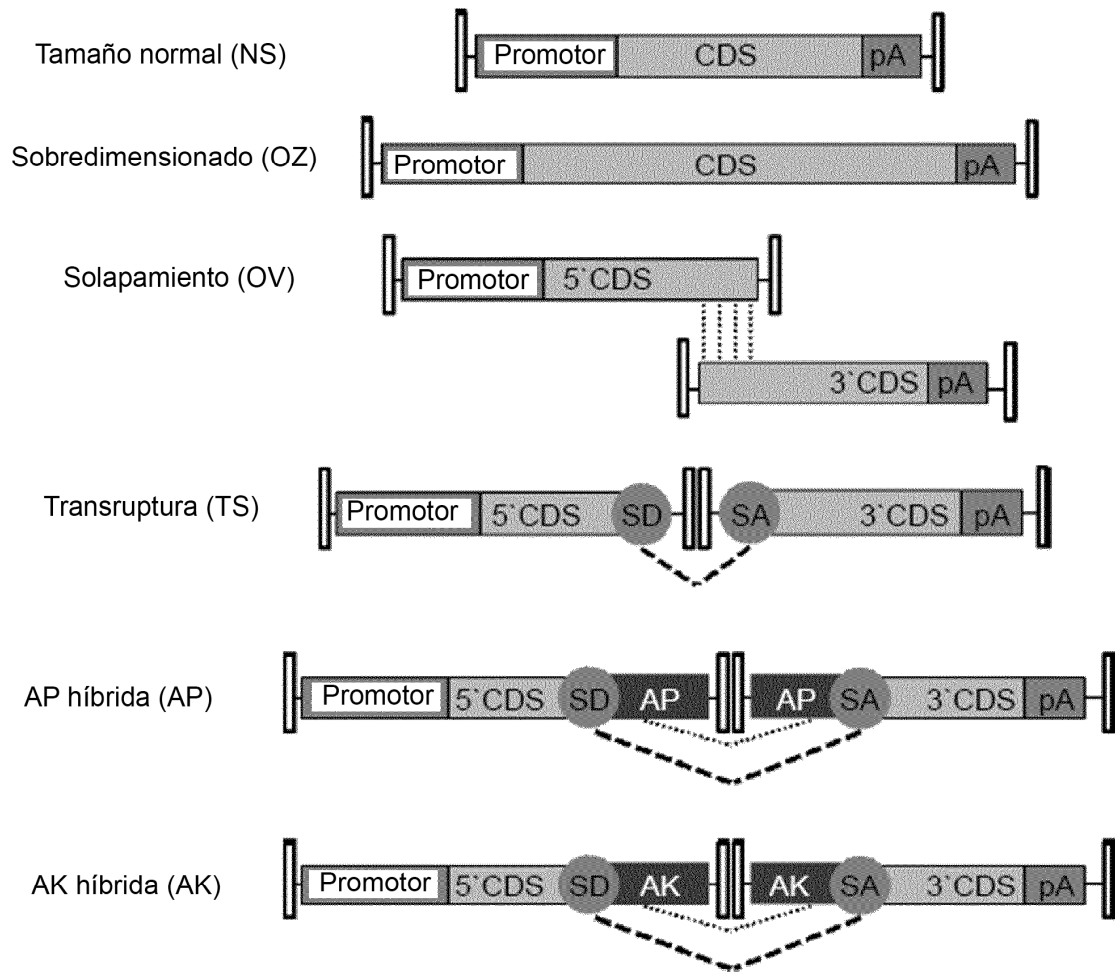


Fig. 1

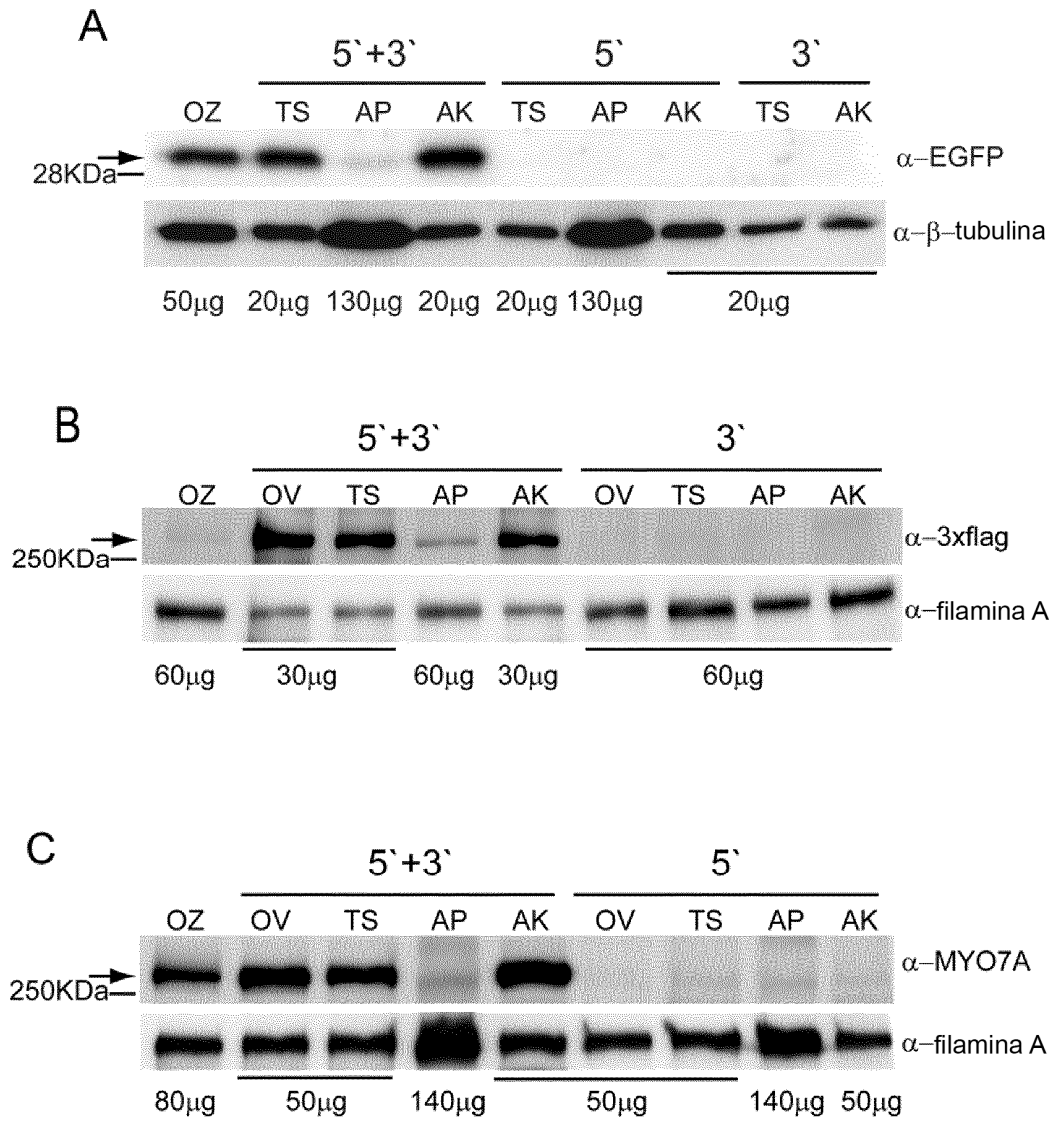
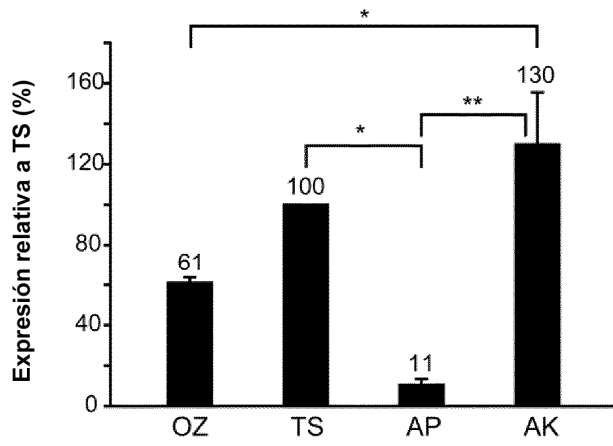
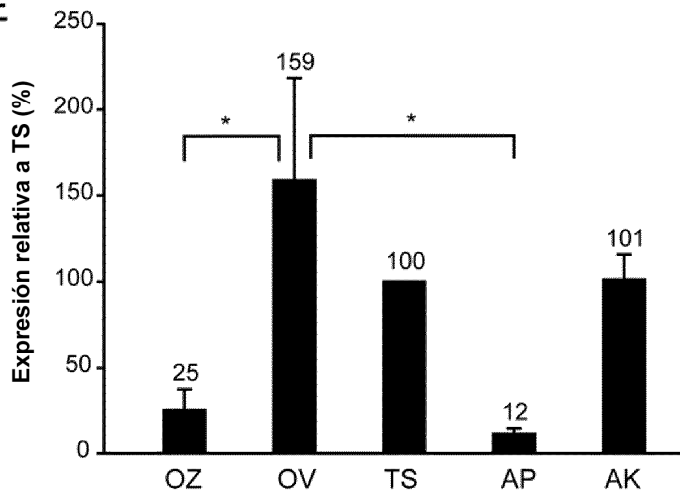


Fig. 2(1/2)

D



E



F

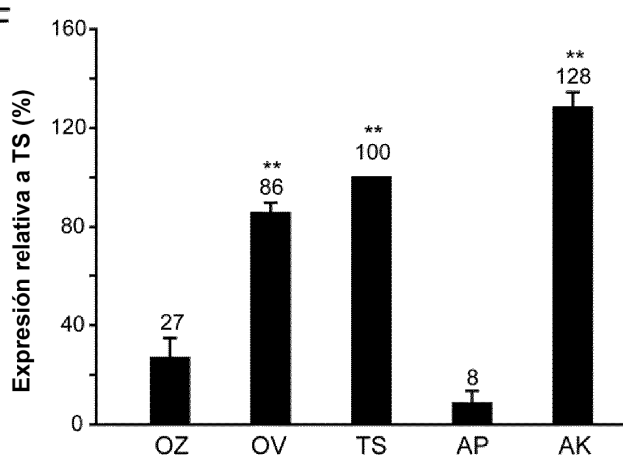


Fig. 2 (2/2)

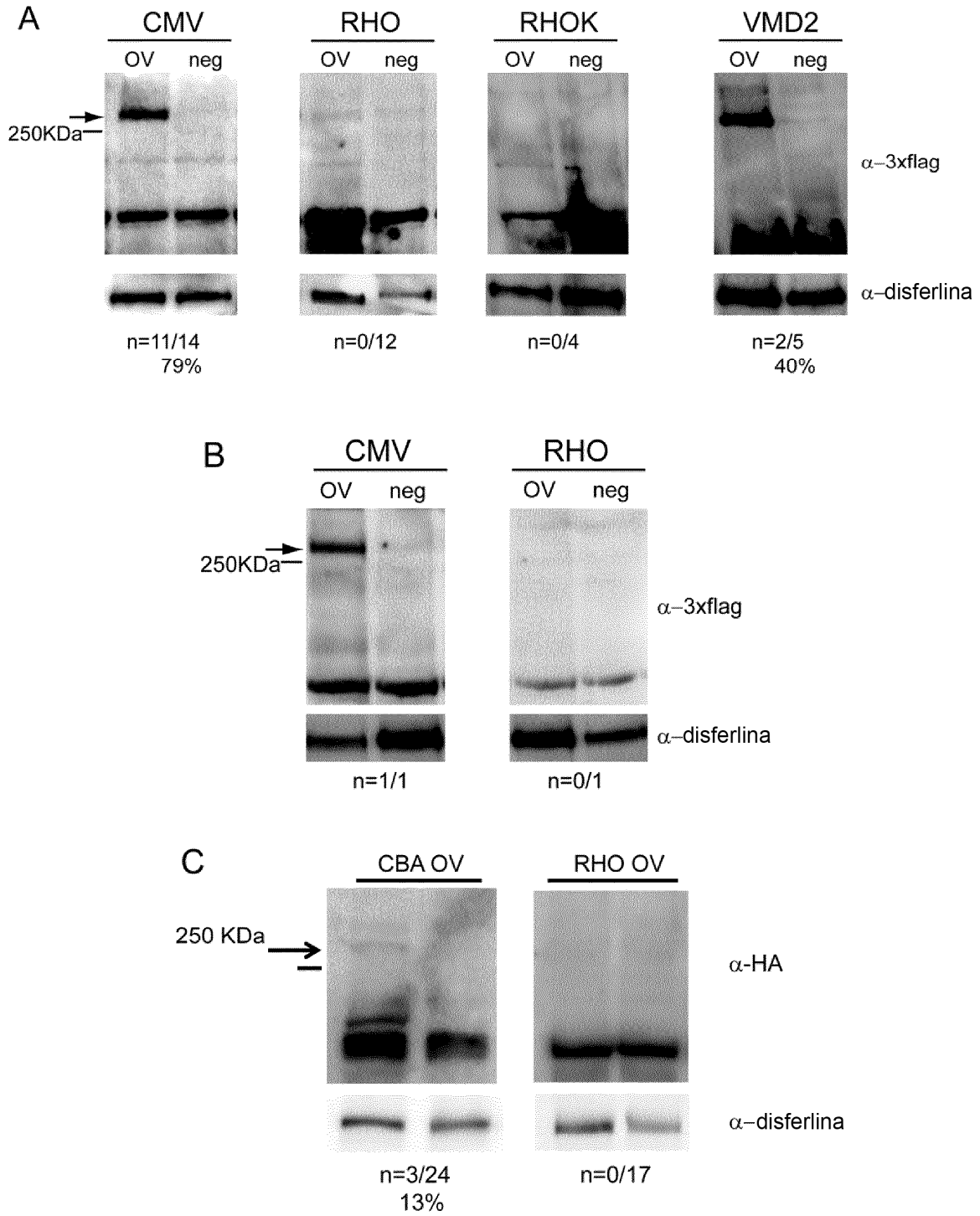


Fig. 3

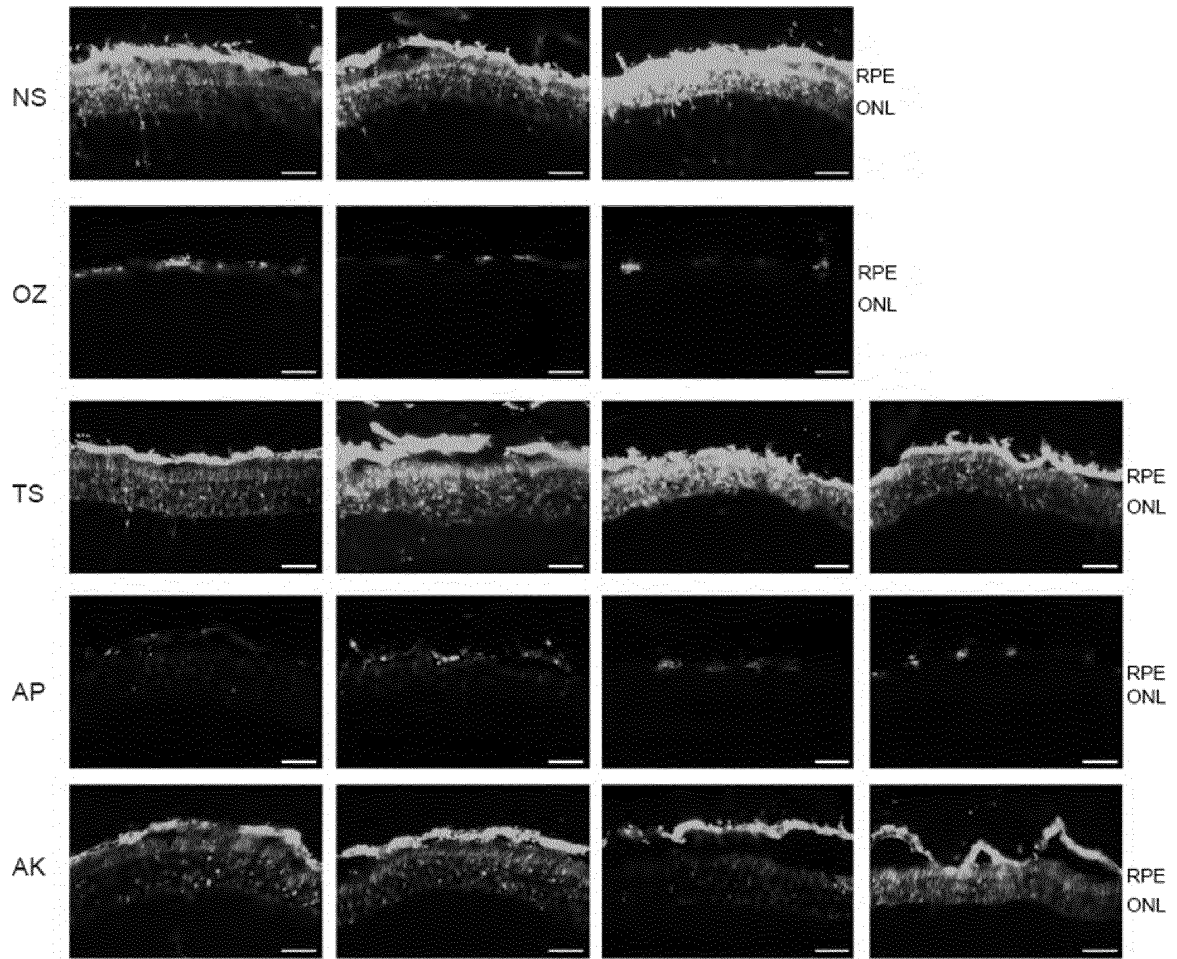


Fig. 4

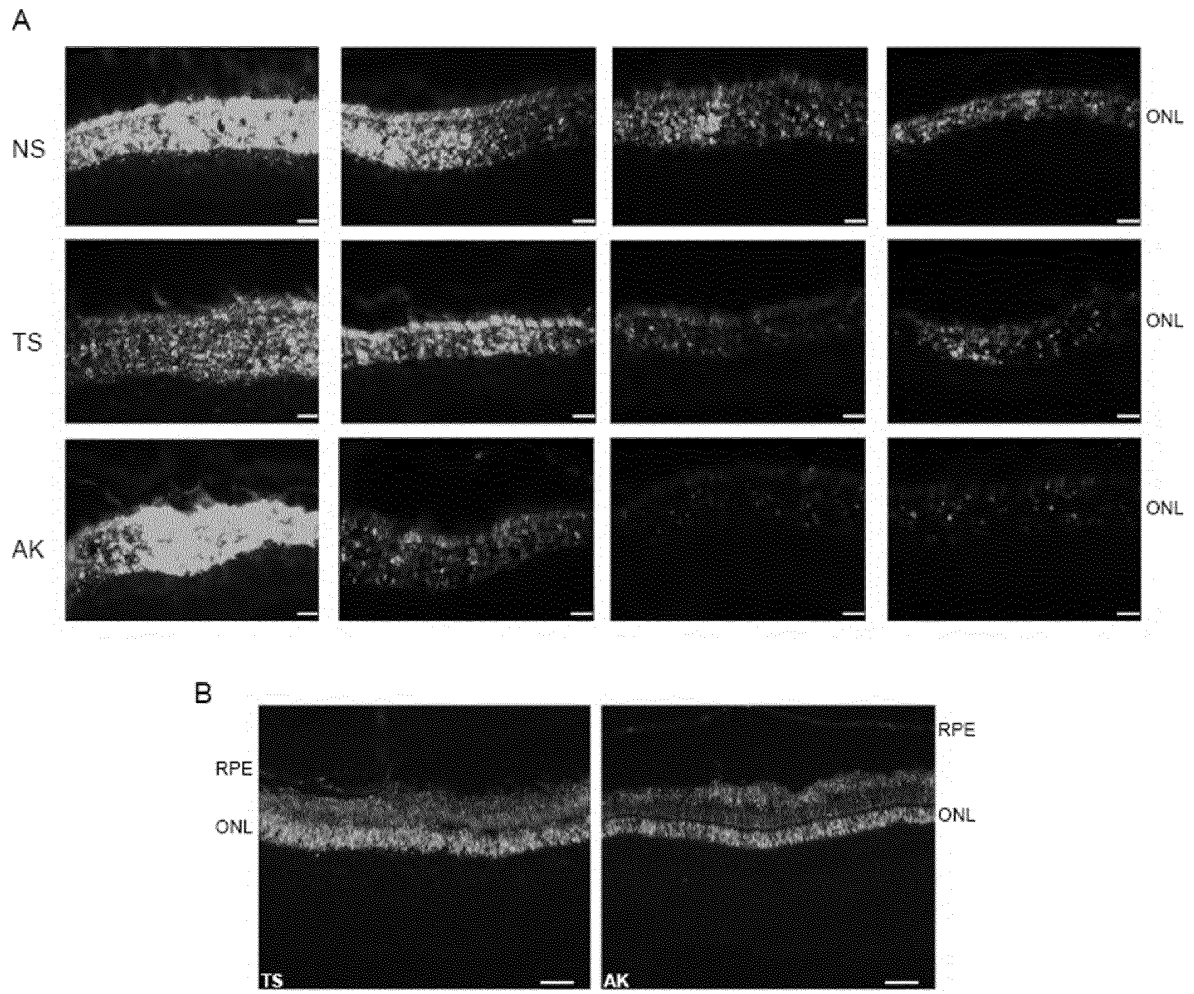


Fig. 5

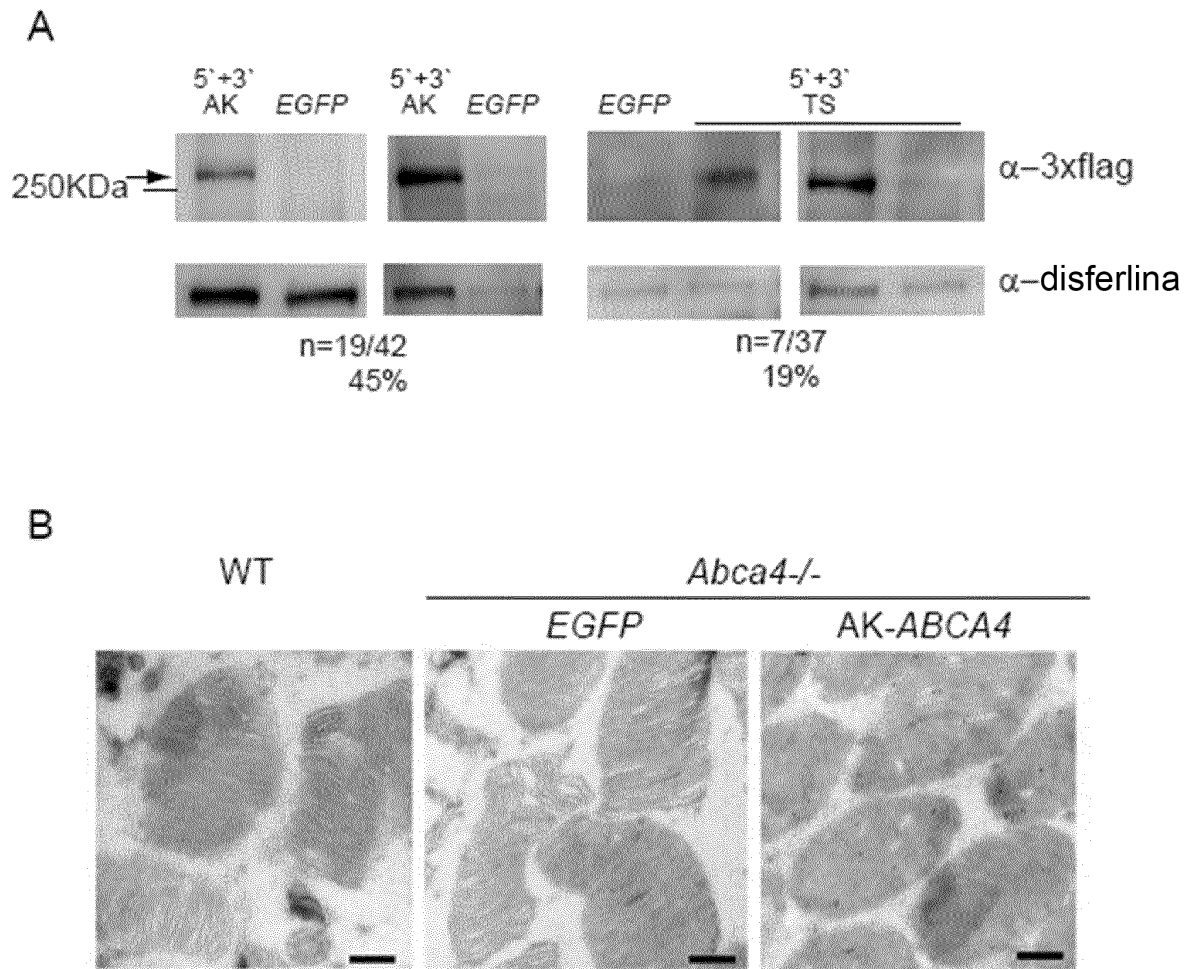


Fig. 6





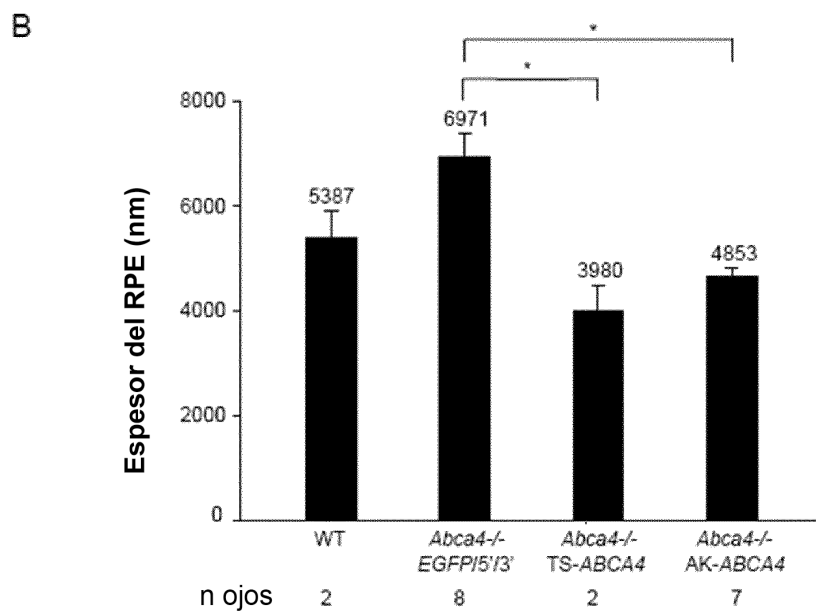
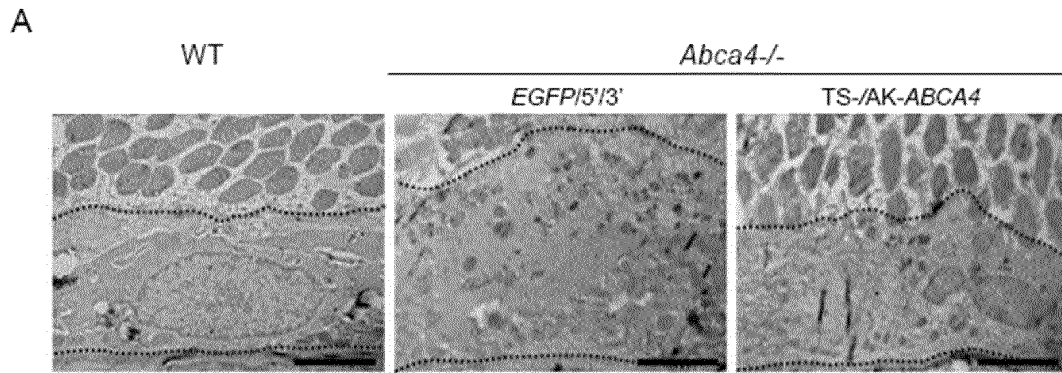


Fig. 8

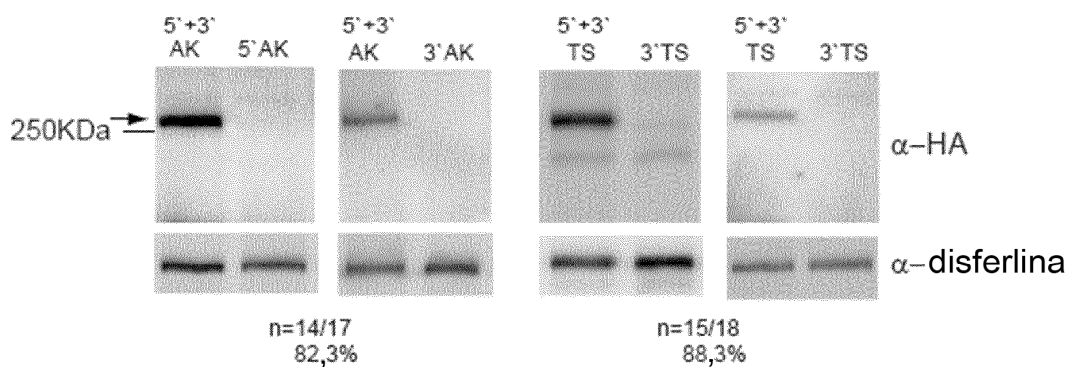
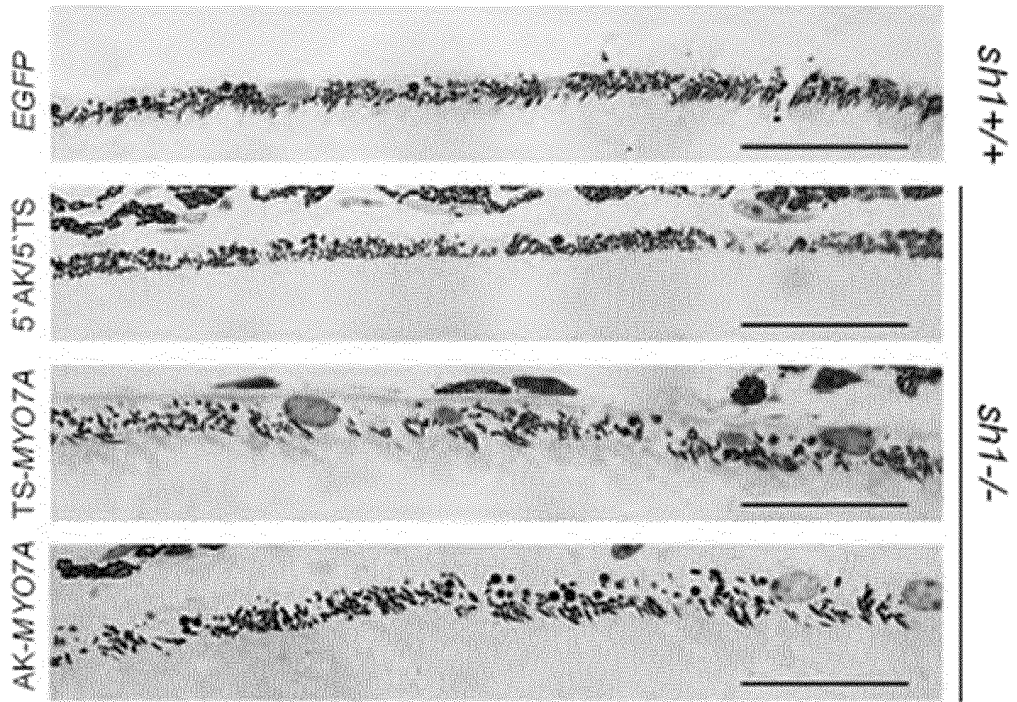


Fig. 9

A



B

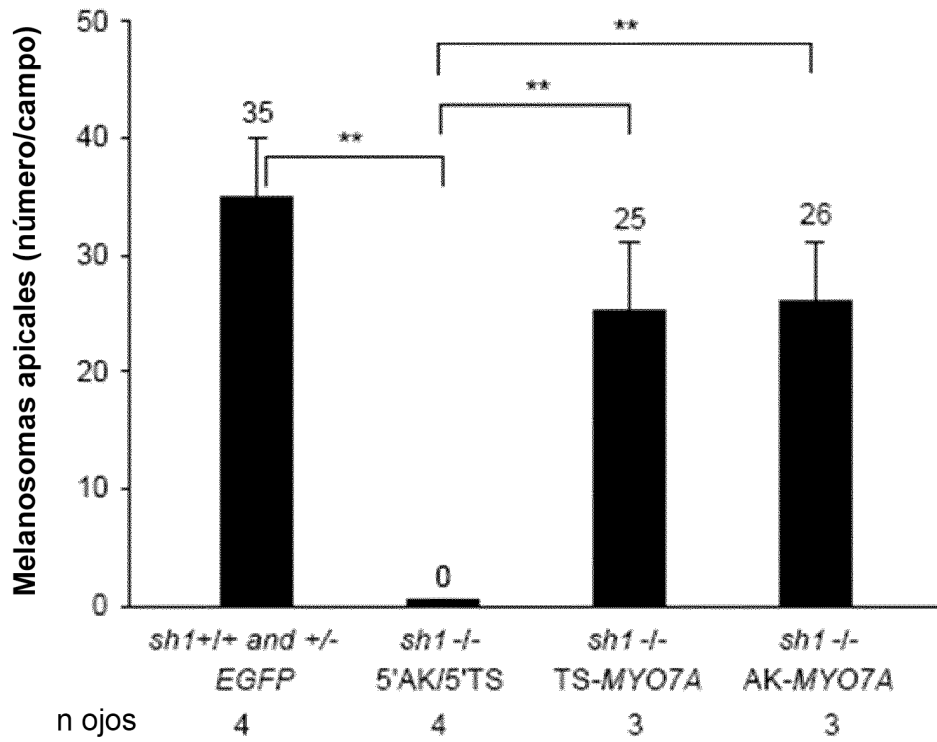


Fig. 10

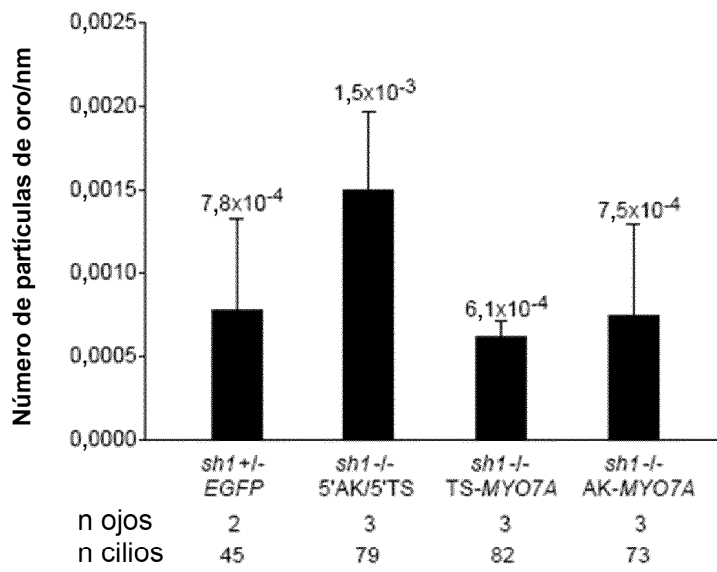
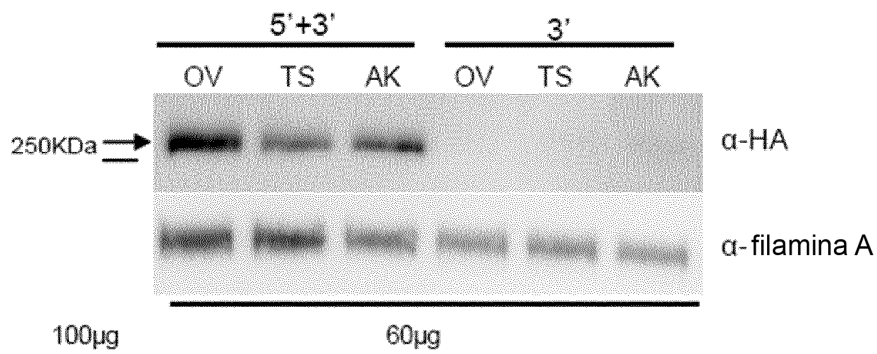


Fig. 11

**A**



**B**

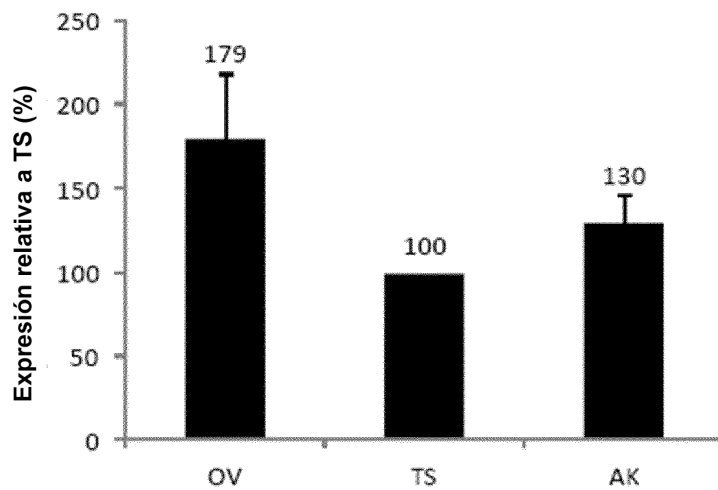


Fig. 12

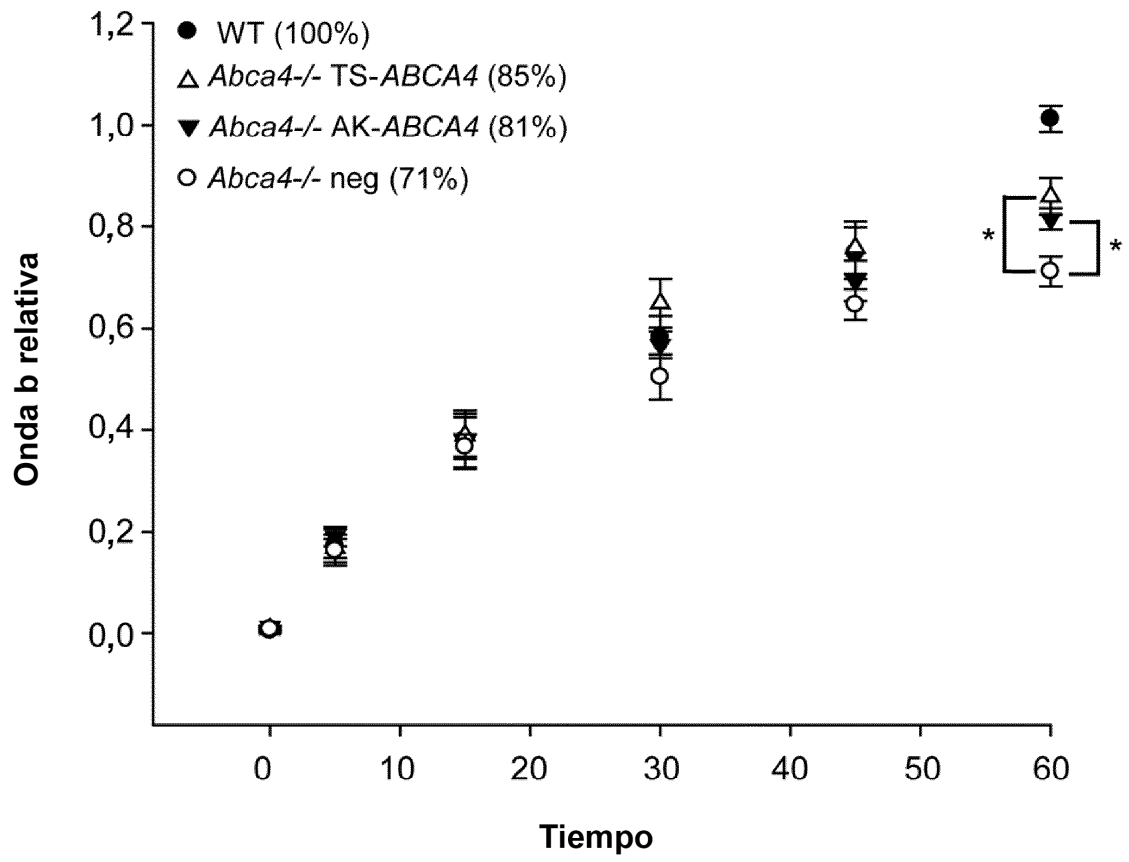


Fig. 13

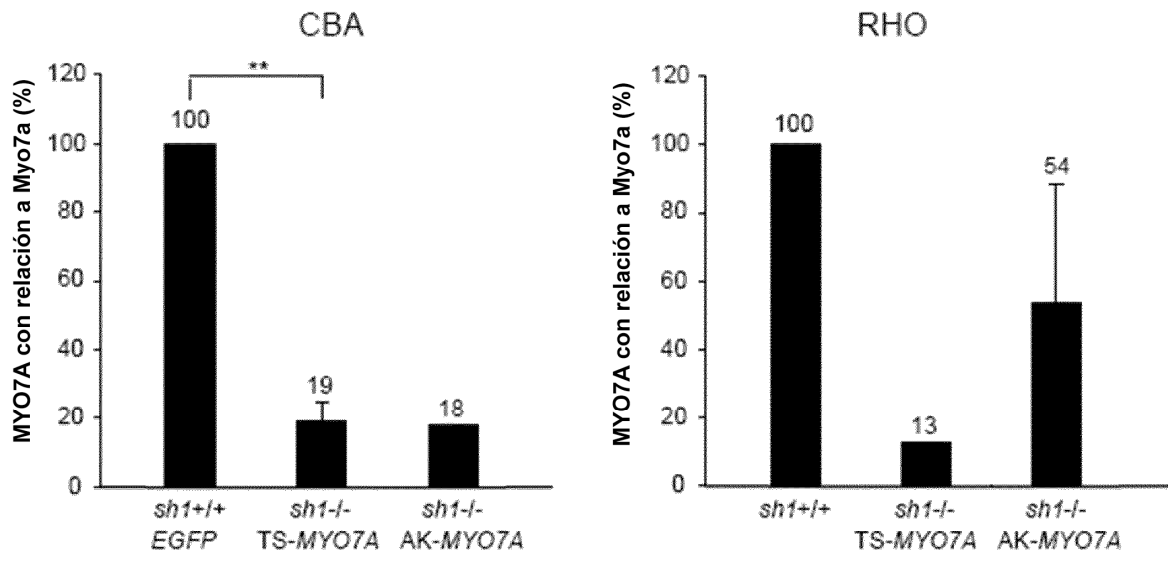


Fig. 14

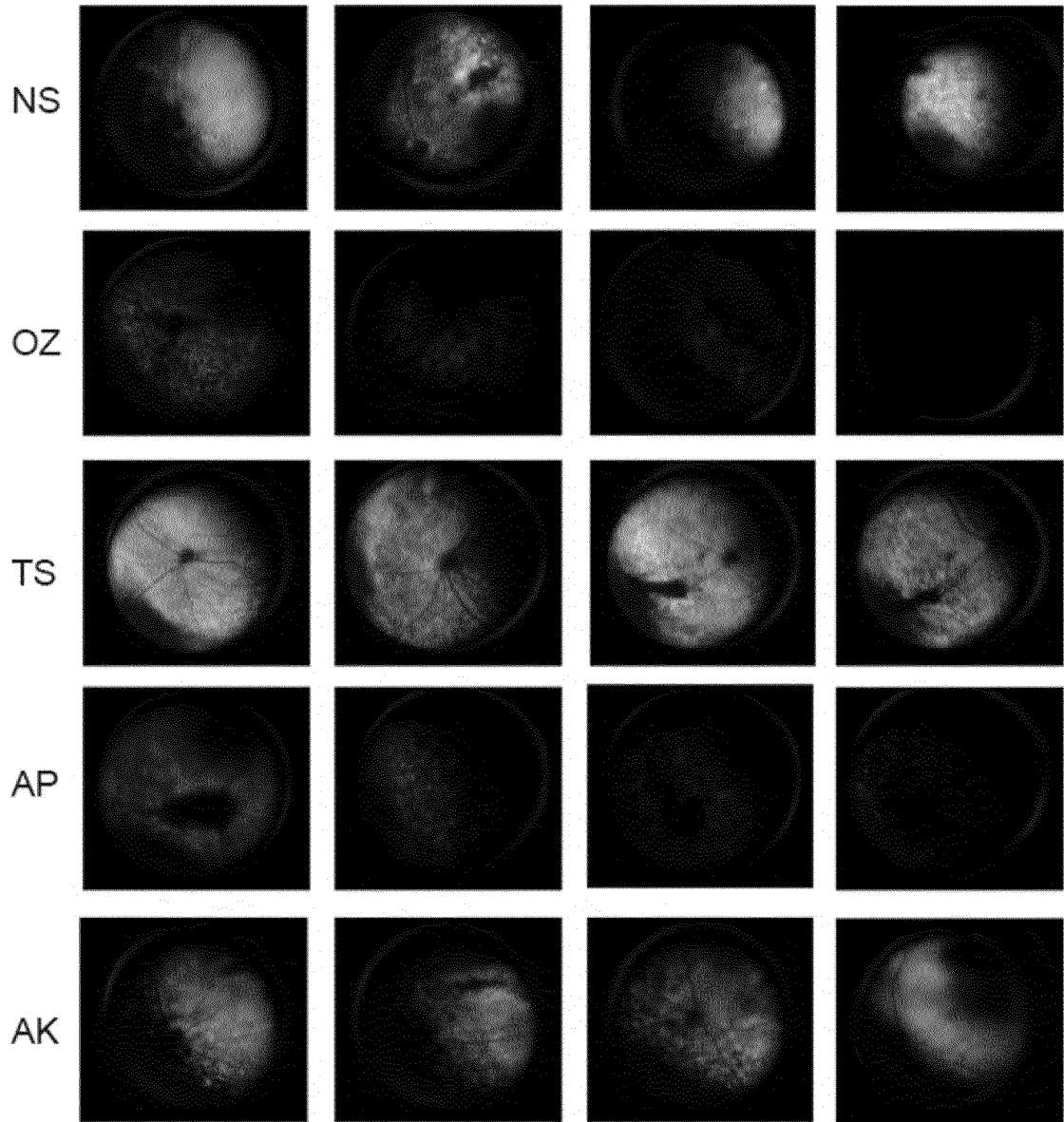


Fig. 15

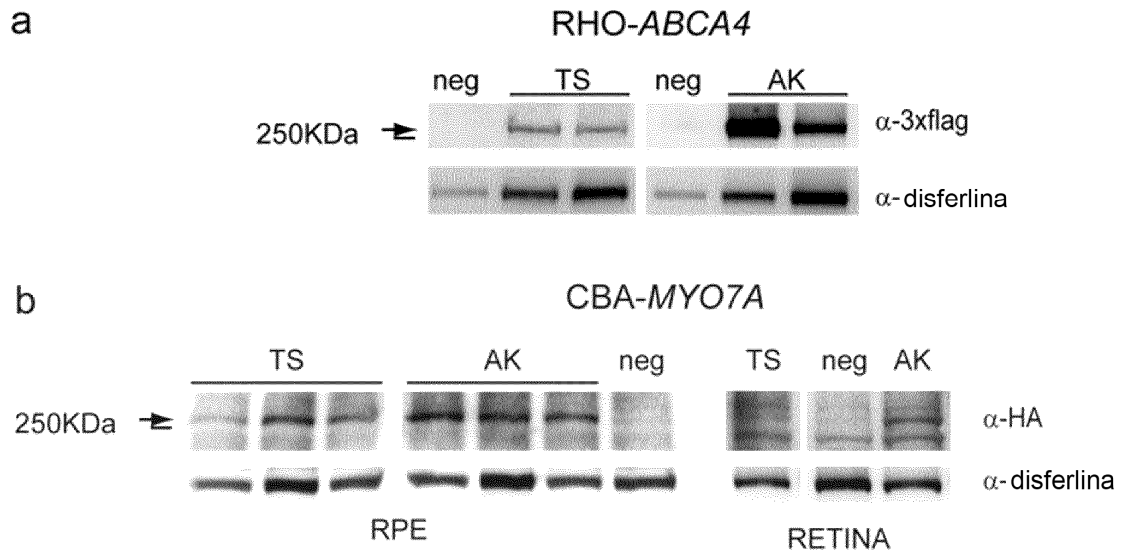


Fig. 16

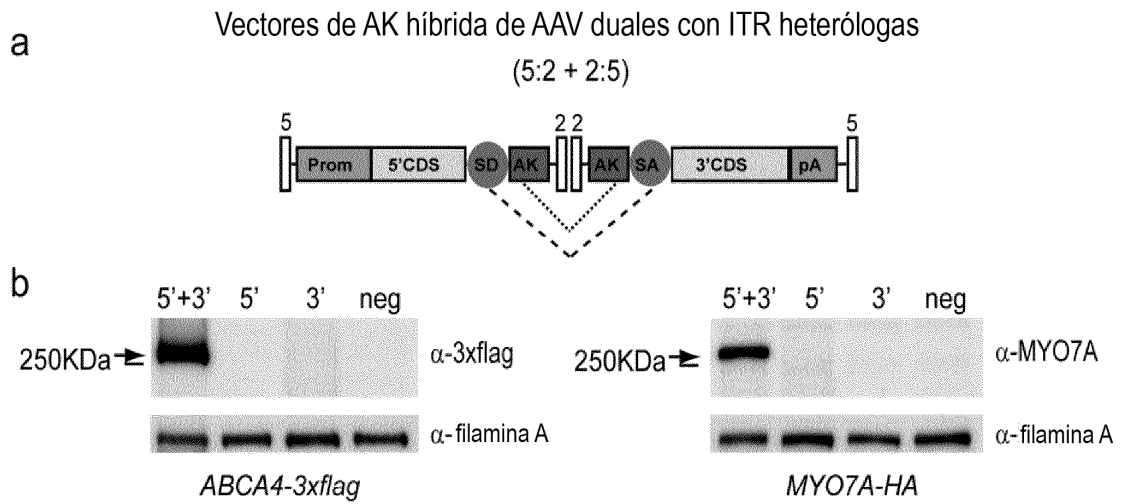


Fig. 17