

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 779**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

**A61P 27/02** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.10.2012 PCT/US2012/062106**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13063383**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2012 E 12843778 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2797613**

54 Título: **Vectores que codifican el factor de viabilidad de conos derivado de bastones**

30 Prioridad:

**27.10.2011 US 201161552155 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.07.2020**

73 Titular/es:

**WELLSTAT OPHTHALMICS CORPORATION  
(100.0%)  
14200 Shady Grove Road, Suite 600  
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**LUO, TIANCI**

74 Agente/Representante:

**SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio**

**ES 2 774 779 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

Vectores que codifican el factor de viabilidad de conos derivado de bastones

## 5 Información de concesión

La invención se realizó con el apoyo gubernamental bajo la Concesión de SBIR No. EY016262 otorgada por el Departamento de Salud y \_Servicios Humanos de los Estados Unidos de América, Instituto Nacional de Salud. El gobierno puede tener ciertos derechos en la invención.

10

## Antecedentes de la invención

El RdCVF es una proteína similar a tioredoxina expresada específicamente por las células fotorreceptoras de bastones en la retina (Léveillard y otros (2004) Nature Genetics 36:755-759 y la información complementaria). Dos diferentes genes de RdCVF se encuentran en los humanos y se designan RdCVF1 y RdCVF2. Ambos genes de RdCVF codifican dos productos por vía de un empalme alternativo: una proteína de longitud completa y una proteína truncada pos-transcripcionalmente C-terminal, conocidas como RdCVF-largo y RdCVF-corto, respectivamente.

15

El RdCVF-corto se describe como un factor trófico secretado para promover la supervivencia de conos y el RdCVF-largo como una enzima activa en la redox que interactúa con proteínas intracelulares (Léveillard y otros (2010) Sci Transl Med. 2(26): 26ps16). Por ejemplo, tau se describe como un socio de unión para el RdCVF-L y tau es exclusivamente intracelular (Fridlich y otros (2009) Molecular & Cellular Proteomics 8(6):1206-18).

20

Se descubrió que los individuos que padecen de algunas distrofias retinianas tienen niveles más bajos de la proteína RdCVF en sus ojos que los individuos sin distrofias retinianas (Publicación del PCT WO02/081513).

25

Se ha demostrado que diferentes formas de proteína RdCVF pueden promover la supervivencia de células fotorreceptoras de los conos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, las inyecciones intraoculares de la forma corta de la proteína RdCVF proteína RdCVF1 (RdCVF 1S) humana no solo evitaron la degeneración de las células de conos sino que también conservaron su función en modelos animales de degeneración retiniana heredada (Yang y otros (2009) Mol Therapy 17:787-795). Sin embargo, la demostración del efecto protector de células de conos *in vivo* de esta proteína requirió el uso de múltiples inyecciones intraoculares.

30

La expresión de niveles significativos de RdCVF a gran escala y de vectores de terapia génica ha sido un desafío, por ejemplo, véase la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 20110034546, párrafo [0004].

35

Una mención o análisis de una referencia en la presente descripción no debe interpretarse como una admisión de que ésta es la técnica anterior para la presente invención.

## 40 Resumen de la invención

La invención se define en las reivindicaciones. Los aspectos/casos de la presente invención que constituyen la invención se definen en las reivindicaciones.

La presente descripción se refiere, en parte, a ácidos nucleicos que codifican el RdCVF, construcciones de expresión de RdCVF, vectores de RdCVF, métodos para expresar RdCVF, métodos para ralentizar, prevenir o inhibir la muerte de células fotorreceptoras (*por ejemplo*, células de conos y/o bastones), tratamiento de enfermedades oculares, tales como distrofias retinianas, y tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tal como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson o una enfermedad olfativa.

50

La presente descripción proporciona composiciones, métodos para la expresión de proteínas RdCVF a partir de una(s) célula(s) y métodos de tratamiento.

Algunos casos de la descripción proporcionan ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia codificante para una proteína RdCVF, en donde la secuencia codificante de RdCVF comprende una secuencia de nucleótidos recodificada.

55

La descripción también incluye vectores virales que comprenden un ácido nucleico, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia codificante para una proteína RdCVF, en donde la secuencia codificante de RdCVF comprende una secuencia de nucleótidos recodificada.

60

Algunos casos de la descripción se refieren a una célula aislada que comprende un ácido nucleico de la descripción.

Otras casos de la descripción se refieren a una proteína RdCVF producida por una célula de la descripción o a partir de un ácido nucleico de la descripción. En algunos casos, una proteína RdCVF no es una secuencia de aminoácidos de RdCVF de origen natural.

65

En la descripción se incluyen también preparaciones farmacéuticas que comprenden (i) un portador farmacéuticamente aceptable y (ii) un ácido nucleico de la descripción, un vector viral de la descripción, una proteína RdCVF de la descripción o una combinación de los mismos.

5 También se proporcionan métodos para producir una proteína RdCVF que comprende cultivar una célula de la descripción en condiciones que permitan la expresión y secreción de la proteína RdCVF y aislar la proteína RdCVF del cultivo de células.

10 Algunos casos de la descripción se refieren a métodos para conservar células de bastones oculares que comprenden administrar al ojo de un mamífero un ácido nucleico de la descripción, un vector viral de la descripción, una proteína RdCVF de la descripción o una combinación de los mismos.

15 La descripción también proporciona métodos para tratar enfermedades tales como distrofia retiniana, enfermedad de Stargardt, retinitis pigmentaria, degeneración macular seca relacionada con la edad (AMD seca), atrofia geográfica (etapa avanzada de AMD seca), degeneración macular húmeda relacionada con la edad (AMD húmeda), glaucoma con o sin hipertensión ocular, retinopatía diabética, síndrome de Bardet-Biedel, síndrome de Bassen-Kornzweig, enfermedad de Best, coroideremia, atrofia girata, amaurosis congénita, síndrome de Refsun, síndrome de Usher, enfermedad ocular relacionada con la tiroides, enfermedad de Grave, una enfermedad asociada con células epiteliales, pigmentadas, retinianas, enfermedad del segmento anterior, enfermedad de las lentes/cataratas, trastorno de cápsula ocular, uveítis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson o una enfermedad olfativa.

20 Algunos casos de la descripción se refieren a métodos para conservar células de bastones oculares que comprenden administrar al ojo de un mamífero el ácido nucleico y/o vector viral de la descripción, en donde el ácido nucleico y/o el vector viral se administra mediante una inyección subretiniana y las células de bastones se conservan en un sitio diferente al sitio de la inyección subretiniana.

25 Algunos casos de la descripción se refieren a métodos para conservar células de conos oculares que comprenden administrar al ojo de un mamífero el ácido nucleico y/o vector viral de la descripción, en donde el ácido nucleico y/o el vector viral se administra mediante una inyección subretiniana y las células de conos se conservan en un sitio diferente del sitio de la inyección subretiniana.

La descripción también proporciona métodos para secretar una proteína RdCVF a partir de una célula que comprenden administrar a la célula un ácido nucleico o un vector viral de la descripción.

35 Una proteína RdCVF puede ser una proteína RdCVF1 o RdCVF2 o una versión larga o corta.

40 Se contempla que cualquier método o composición descrito en la presente descripción se puede implementar con respecto a cualquier otro método o composición descrito en la presente descripción. El uso de la palabra “un” o “una” cuando se usa en conjunción con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar “uno”, pero también es consistente con el significado de “uno o más”, “al menos uno” y “uno o más de uno”. El uso del término/frase “y/o” cuando se utiliza con una lista significa que uno o más de los elementos listados pueden usarse, *por ejemplo*, no está limitado a uno o la totalidad de los elementos.

45 Este resumen de la descripción no describe necesariamente todas las características o características necesarias de la descripción. La descripción también puede residir en una subcombinación de las características descritas.

#### Breve descripción de las figuras

50 Con el propósito de ilustrar la descripción, se representan en los dibujos ciertos casos de la descripción. Sin embargo, la descripción no está limitada a las ordenaciones y procedimientos precisos de los casos representadas en los dibujos.

55 La Figura 1 muestra un análisis de SDS-PAGE de partículas de vectores AAV-RdCVF1L y AAV-GFP recombinantes purificados. Las proteínas de una preparación de rAAV-GFP (carril 1) y dos preparaciones de rAAV-RdCVF1L (carriles 2 y 3) se separaron por medio del SDS-PAGE y se visualizaron mediante el análisis de tinción de plata.

60 Las Figuras 2A y 2B muestran un análisis de inmunotransferencia Western de la expresión de RdCVF1L en células ARPE-19 transducidas con el vector rAAV-RdCVF1L. El lisado celular (Figura 2A) y el sobrenadante (Figura 2B) de las células ARPE-19 transducidas con rAAV se separaron por medio del SDS-PAGE y una Inmunotransferencia Western se realizó contra la proteína RdCVF1L. El carril 1 muestra el lisado celular ARPE-19 no transducidas (Figura 2A) y el sobrenadante para el control (Figura 2B), el carril 2 y el carril 3 muestran lisados de células (Figura 2A) y sobrenadante (Figura 2B) de células ARPE-19 transducidas con rAAV-GFP y rAAV-RdCVF1L, respectivamente.

65 La Figura 3 muestra la confirmación de expresión de RdCVF incrementada en ojos inyectados con rAAV-RdCVF1L contra rAAV-GFP y ojos no tratados de ratones Balb/C normales por medio de la inmunotransferencia Western seis semanas después de la inyección de los vectores. Los extractos de proteínas de células ARPE-19 transducidas con rAAV-RdCVF1L se utilizaron como un control positivo (Carriles 14 y 17) mientras que el extracto de células no

transducidas se usó como un control negativo (Carril 15). La proteína RdCVF se detectó en ojos inyectados con rAAV-RdCVF1L (Carriles 6, 8, 10 y 12) mientras que no se observó o solo se observaron bandas débiles que correspondían al RdCVF en los ojos contralaterales no tratados en los mismos animales (Carriles 7, 9, 11 y 13) así como también en ojos inyectados con rAAV-GFP (Carriles 2-5). El Carril 1 es un marcador estándar de proteína. El Carril 16 es el extracto de proteína de un ojo de ratón normal de tipo silvestre.

La Figura 4 muestra una tinción inmunohistoquímica del RdCVF en células RPE de soportes planos RPE-coroideas-esclerales. La expresión robusta de RdCVF se observó en el ojo inyectado con rAAV-RdCVF1L de ratones Balb/C normales seis semanas después de la inyección del vector (Figura 4A), pero no en el ojo contralateral no inyectado (Figura 4B). No se observó inmunorreactividad en la muestra procesada sin anticuerpo primario (Figura 4C). Los soportes planos se contratiñeron con DAPI para mostrar los núcleos de células en color azul.

La Figura 5 muestra la tinción inmunohistoquímica de RdCVF1L de soportes planos neuroretinianos. La expresión robusta de RdCVF1L se observó en las células fotorreceptoras en el ojo inyectado con rAAV-RdCVF1L de ratones Balb/C normales seis semanas después de la inyección del vector (Figura 5A). La mayoría de la tinción fue en los segmentos exteriores de células fotorreceptoras. En contraste, solo se observó tinción de fondo en las células fotorreceptoras en el ojo contralateral no inyectado (Figura 5B). No se observó inmunorreactividad en las muestras procesadas sin anticuerpo primario (Figura 5C).

La Figura 6 muestra resultados para estudios que demostraron la expresión de RdCVF1L en células RPE y fotorreceptoras 5 semanas después de la inyección subretiniana de AAV-RdCVF1L en ratones *rd10*. Las células RPE que expresaban RdCVF se observaron en aproximadamente la mitad del soporte plano RPE-coroide-escleral del ojo inyectado con el vector rAAV-RdCVF1L (A), pero no en el ojo contralateral no inyectado (B). Las células fotorreceptoras (C) también se transdujeron como segmentos que expresaban el RdCVF como se observó en la retina montada en plano del mismo ojo. En contraste, no se encontró la expresión de RdCVF en el ojo contralateral no inyectado (D). Las células de color verde oscuro en (D) son probablemente macrófagos autofluorescentes adheridos a la retina. La vista de alta magnificación de células RPE transducidas (E), que mantienen una morfología hexagonal típica, y segmentos de fotorreceptores que expresan el RdCVF (F).

La Figura 7 muestra un rescate de fotorreceptores mediante la inyección subretiniana de AAV-RdCVF1L en ratones *rd10*. Las fotomicrografías iluminadas de secciones retinianas representativas de 2 ratones en los cuales los ojos derechos recibieron rAAV-RdCVF1L en el día posnatal 3 (A y C) y los ojos izquierdos (B y D) sirven como controles no tratados. Los ratones *rd10* se sacrificaron a las 5 semanas de edad. Se debe observar la diferencia en el espesor de la capa nuclear exterior (ONL, por sus siglas en inglés) entre ojos tratados (flechas de doble cabeza) y no tratados (flechas de cabeza individual). Existen 2-4 hileras en los ojos tratados con AAV-RdCVF (A y C) contra 1 hilera en ojos no tratados (B y D). Los segmentos interiores y exteriores de fotorreceptores permanecieron en algunas áreas de la retina protegida (E). IS, segmentos interiores; OS, segmentos exteriores; ONL, capa nuclear exterior.

La Figura 8 muestra una fotomicrografía iluminada de una cápsula ocular de un ratón *rd10* de 5 semanas de edad representativo que recibió una inyección subretiniana de rAAV-RdCVF1L en un ojo (Panel A, Figura 8) y ningún tratamiento en el ojo contralateral (Panel B, Figura 8). Como se muestra, más células fotorreceptoras se conservaron en el ojo tratado.

La Figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos anotada de rAAV-RdCVF1L.

Figura 10A: el suministro de rAAV-RdCVF1L mejora la función retiniana en los ratones *rd10*. Los ERG se realizaron en aproximadamente 5 semanas después de la inyección del rAAV-RdCVF1L. Las mediciones de respuestas de ERG de los 8 ratones sometidos a prueba muestran que las amplitudes promedio de ondas-b de ojos tratados fueron aproximadamente 3 veces más grandes que aquellas de ojos semejantes no tratados, lo cual fue estadísticamente significativo ( $p=0,025$ ).

Figura 10B: el suministro de rAAV-RdCVF1L mejora la función retiniana en los ratones *rd10*. Los ERG se realizaron en aproximadamente 5 semanas después de la inyección del rAAV-RdCVF1L. Panel derecho: Estos son el promedio de ocho formas de onda del ojo tratado (línea negra,  $n=8$ ) y ojos semejantes no tratados (línea roja,  $n=8$ ) los cuales se registraron a la intensidad de 25  $cd.s/m^2$  de destellos de luz individuales bajo el fondo oscuro. Obviamente, los ojos tratados tuvieron una respuesta mucho más alta que los ojos semejantes. Panel izquierdo: Las mediciones de respuestas de ERG de los 8 ratones que se sometieron a prueba muestran que las amplitudes promedio de onda-b de ojos tratados fueron aproximadamente 3 veces más grandes que aquellas de ojos semejantes no tratados, lo cual fue estadísticamente significativo ( $p=0,025$ ).

Figuras 11A y 11B: Conservación de fotorreceptores por inyección subretiniana de rAAV-RdCVF1L en ratones *rd10*. Las fotomicrografías iluminadas de secciones retinianas representativas de un ratón en el cual el ojo derecho recibió rAAV-RdCVF1L en el día posnatal 3 (A) y el ojo izquierdo (B) sirvió como controles no tratados. Se debe observar la diferencia en el espesor de ONL entre el ojo tratado y el ojo no tratado. Hubo aproximadamente 4 hileras en el ojo tratado (A) contra 1 hilera en los ojos no tratados (B). Los segmentos exteriores de fotorreceptores permanecieron en algunas áreas de la retina protegida; onl, capa nuclear exterior.

Figura 12: Comparación del espesor de la capa nuclear exterior (ONL) en ojos tratados con rAAV-RdCVF1L contra ojos no tratados en ratones rd10. El espesor promedio de ONL en los ojos tratados (barra roja) es significativamente mayor ( $P=0,006$ ) que aquel en los ojos no tratados (barra negra). Los números representan la media  $\pm$  SD.

5 Descripción detallada de la invención

Como se usa en la presente descripción, el término transitorio “que comprende” es indefinido. Una reivindicación que utiliza este término puede contener elementos además de aquellos mencionados en esta reivindicación. De esta manera, por ejemplo, las reivindicaciones pueden versar sobre métodos que también incluyen otros pasos no mencionados específicamente en las mismas, siempre y cuando estén presentes los elementos mencionados o sus equivalentes.

Los términos “identidad” e “idénticos” cuando se utilizan en el contexto en comparación con dos secuencias, tales como secuencias de nucleótidos o aminoácidos, se refieren al porcentaje de la secuencia que se alinea entre las dos secuencias. El porcentaje de identidad se puede determinar por medio de algoritmos empleados comúnmente por aquellas personas expertas en este campo. Por ejemplo, el porcentaje de identidad se puede determinar con el uso de herramientas y programas disponibles del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI, por sus siglas en inglés) disponibles en su sitio web. El porcentaje de identidad de dos secuencias de nucleótidos se puede determinar, por ejemplo, con el uso del paquete de NCBI/BLAST/blastn. El blastn puede usarse con los parámetros establecidos en: umbral esperado=10; tamaño de palabra=28; similitudes máximas en un intervalo desconocido=0; registros de similitudes/disimilitudes=1,-2; costos de apertura=existencia:5 extensión:2.

Las publicaciones del PCT WO2002/081513, WO2008/148860 y WO2009/146183 describen varias composiciones y métodos relacionados con RdCVF. En algunos casos, las composiciones y métodos relacionados con RdCVF descritos en las publicaciones PCT WO2002/081513, WO2008/148860 y WO2009/146183 pueden usarse, por ejemplo, al reemplazar un ácido nucleico que codifica RdCVF, vector o proteína por aquellos de la presente descripción, *por ejemplo*, ácidos nucleicos y vectores que comprenden una secuencia codificante de RdCVF de tipo silvestre).

Algunos casos de la descripción proporcionan secuencias de aminoácidos de la proproteína de RdCVF tales como las SEQ ID NO:2 y 4. La descripción también proporciona secuencias de nucleótidos que codifican proproteínas de RdCVF tales como las SEQ ID NO:1, 3 y 11.

La descripción también proporciona métodos para tratar una enfermedad en un sujeto donde la enfermedad es mediada por o está asociada con un cambio en la expresión de genes de RdCVF1 o RdCVF2 (por ejemplo, una disminución en la presencia del polipéptido de RDCVF1 o RDCVF2 en el ojo) mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico o vector que codifica una proteína RdCVF1 o RDCVF2 o una proteína relacionada o un fragmento o porción de la misma a un sujeto.

En otro aspecto, la proteína RdCVF, ácido nucleico, vector o composición de la descripción puede usarse en la fabricación de un medicamento, por ejemplo, para tratar enfermedades enumeradas en la presente descripción.

Los productos, composiciones, procesos y métodos de la descripción pueden usarse para, entre otros, propósitos de investigación, biológicos, clínicos o terapéuticos.

45 RdCVF

Se ha demostrado que una proteína RdCVF puede promover la supervivencia de células fotorreceptoras de conos *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, las inyecciones intraoculares de la forma corta de la proteína RdCVF1 (RdCVF1S) humana no solo rescató células de conos de la degeneración sino que también conservó su función en modelos animales de degeneración retiniana heredada. (Yang y otros (Mol Therapy (2009) 17:787-795 y el material complementario). El RdCVF es expresado por varios tipos de células que incluyen las células fotorreceptoras de bastones en la retina (Léveillard y otros (2004) Nature Genetics 36:755-759).

Dos diferentes genes de RdCVF se encuentran en humanos y otros mamíferos y se designan como RdCVF1 y RdCVF2. Ambos genes de RdCVF codifican dos productos por vía del empalme alternativo: una proteína de longitud completa y una proteína truncada C-terminal, conocidas como RdCVF-largo y RdCVF-corto, respectivamente.

En algunos casos, la descripción incluye una secuencia codificante de RdCVF recodificada. Una secuencia codificante de RdCVF recodificada puede codificar cualquier proteína RdCVF que incluya cualquiera de aquellas dadas a conocer en la presente descripción. Las secuencias para varias proteínas RdCVF se pueden encontrar en las Publicaciones del PCT Nos. WO2002081513 y WO2010029130; Chalmel y otros (BMC Molecular Biology (2007) 8:74 páginas 1-12 y la información complementaria); Leveillard y otros (Nature Genetics (2004) 36:755-759 y la información complementaria); Yang y otros (Mol Therapy (2009) 17:787-795 y el material complementario) y Nos. de Acceso de GenBank NP\_612463, AAH14127, Q96CM4, EAW84608, CAD67528, Q5VZ03, NP\_001155097, NP\_660326, CAM24748, CAM14247, AAH22521 y CAD67531.

En algunos casos, una proteína RdCVF es un fragmento o un análogo de una proteína RdCVF que retiene una actividad de supervivencia o efecto protector de células de conos y/o células de bastones. Los métodos para medir esas actividades o efectos son conocidos en el campo. Por ejemplo, Léveillard y otros (Nature Genetics (2004) 36:755-759 y la información complementaria) describen modelos de ratones relacionados y métodos *in vitro* para detectar la actividad del RdCVF. Una proteína RdCVF o un RdCVF codificado por un ácido nucleico, pueden tener una secuencia de aminoácidos diferente de una secuencia de aminoácidos de origen natural. Por ejemplo, una proteína RdCVF que no es de origen natural puede contener aminoácidos además de aquellos encontrados en una proteína RdCVF de origen natural (*por ejemplo*, en la terminación amino o carboxi) y/o puede contener sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (*por ejemplo*, sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras) en comparación con una secuencia de aminoácidos de RdCVF de origen natural. Una sustitución de aminoácido conservadora no cambiaría sustancialmente en general las características estructurales de la secuencia precursora (*por ejemplo*, un aminoácido reemplazado no debe tender a romper una hélice que ocurre en la secuencia precursora o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia precursora). Los ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en el campo se describen en Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, Nueva York, N.Y. (1991)); y Thornton y otros. Nature 354: 105 (1991). Las sustituciones conservadoras incluyen, pero no están limitadas a, aquellas de los siguientes agrupamientos: Residuos Ácidos Asp (D) y Glu (E); Residuos Básicos Lys (K), Arg (R) y His (H); Residuos Hidrófilos Sin Carga Ser (S), Thr (T), Asn (N) y Gln (Q); Residuos Alifáticos Sin Carga Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L) e Ile (I); Residuos No Polares Sin Carga Cys (C), Met (M) y Pro (P); Residuos Aromáticos Phe (F), Tyr (Y) y Trp (W); Residuos que contienen un grupo alcohol S y T; Residuos alifáticos I, L, V y M; Residuos asociados con cicloalqueno F, H, W e Y; Residuos hidrófobos A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W e Y; Residuos con carga negativa D y E; Residuos polares C, D, E, H, K, N, Q, R, S y T; Residuos con carga positiva H, K y R; Residuos pequeños A, C, D, G, N, P, S, T y V; Residuos muy pequeños A, G y S; Residuos involucrados a su vez en la formación de A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P y T; y Residuos flexibles Q, T, K, S, G, P, D, E y R. En algunos casos de la descripción, una proteína RdCVF que no es de origen natural tiene aminoácidos adicionales en la terminación amino, *por ejemplo*, aminoácidos adicionales de un péptido de señal heterólogo. En algunos casos, una proteína RdCVF de la descripción se traduce inicialmente de una secuencia codificante de nucleótidos con un péptido de señal y en algunos casos la totalidad o parte de los aminoácidos del péptido de señal se retienen en una proteína RdCVF expresada y/o secretada de la descripción.

#### Secuencias codificantes de RdCVF recodificadas

El término "recodificado" o "secuencia de nucleótidos recodificada" significa que al menos un codón nativo se cambia a un codón diferente que codifica el mismo aminoácido que el codón nativo. En algunos casos, una región codificante de RdCVF recodificada tiene al menos 2,5 %, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos o al menos 95 % de los codones recodificados. En algunos casos, aproximadamente 20-50 %, 35-45 %, 38-42 % o 39-41 % de los codones son recodificados. En algunos casos, un codón recodificado es reemplazado por un codón que se utiliza más prevalentemente en humanos. En algunos casos, al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 % o al menos 55 % de los codones han sido reemplazados por un codón que se utiliza más prevalentemente en humanos.

En algunos casos, una secuencia recodificada tiene entre aproximadamente 70-90 %, aproximadamente 75-85 %, aproximadamente 80-85 % o aproximadamente 82-85 % de identidad con la secuencia codificante nativa, correspondiente. En algunos casos, la secuencia de nucleótidos recodificada tiene al menos 15 % de los nucleótidos diferentes en comparación con una secuencia de nucleótidos nativa, correspondiente. En algunos casos, una secuencia de nucleótidos recodificada es menos de 90 % idéntica a una secuencia de nucleótidos nativa, correspondiente.

La recodificación también puede usarse para cambiar la constitución química de una secuencia codificante de ADN y/o ARN tal como el porcentaje de guanina/citosina (GC). En algunos casos, la recodificación de una región codificante de RdCVF aumenta el contenido de GC a al menos 60 %. En algunos casos, una región codificante de RdCVF recodificada tiene un porcentaje de GC entre 60-64 % o 60,4 %-63,5 %.

La recodificación puede usarse para cambiar la estructura secundaria del ARNm. La recodificación también puede usarse para retirar o añadir configuraciones o sitios particulares a una secuencia codificante o molécula de ácido nucleico, tales como configuraciones inhibitorias de procariotas, sitios donadores de empalmes consensuales, sitios donadores de empalmes crípticos o una combinación de los mismos. En algunos casos, una secuencia codificante de RdCVF recodificada tiene menos configuraciones inhibitorias de procariotas, sitios donadores de empalmes consensuales, sitios donadores de empalmes crípticos o una combinación de los mismos que la secuencia nativa. En algunos casos, una secuencia codificante de RdCVF recodificada no contiene configuraciones inhibitorias de procariotas, no contiene sitios donadores de empalmes consensuales y/o no contiene sitios donadores de empalmes crípticos.

Hoover y otros (Nucleic Acids Res. (2002) 30:e43, páginas 1-7); Fath y otros (PLoS ONE (2011) 6:e17596 páginas 1-14); Graf y otros (J Virol (2000) 74: 10822-10826; Raab y otros Syst Synth Biol (2010) 4:215-225; y solicitud de patente

de los Estados Unidos 20070141557 describen la recodificación de regiones codificantes.

5 En algunos casos de la descripción, una secuencia codificante de RdCVF recodificada no contiene el codón de ATG de RdCVF inicial y/o el codón de parada de RdCVF (*por ejemplo*, TAG). Por ejemplo, una secuencia codificante recodificada de RdCVF se puede unir de manera operativa en dirección 5' o 3' a otra secuencia codificante dando por resultado una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos heteróloga, N-terminal y/o C-terminal hacia la secuencia de aminoácidos de RdCVF, respectivamente. En algunas de esas casos, el codón de ATG de RdCVF inicial y/o el codón de parada de RdCVF se pueden suprimir o pueden estar presentes en la región codificante de RdCVF. Por ejemplo, véase la SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:3. Si otra secuencia codificante se fusiona en el marco en el extremo 3' de una región codificante de RdCVF, entonces el codón de parada de RdCVF nativo no estará presente típicamente en el extremo de la secuencia codificante de RdCVF.

10 En algunos casos, una región codificante de RdCVF recodificada comprende los nucleótidos 106 a 741 de la SEQ ID NO:1, los nucleótidos 106 a 429 de la SEQ ID NO:1, los nucleótidos 106 a 432 de la SEQ ID NO:3 o los nucleótidos 106 a 744 de la SEQ ID NO:3.

15 En algunos casos, una secuencia codificante de RdCVF recodificada es una secuencia recodificada que codifica los aminoácidos 36-246 de la SEQ ID NO:2.

20 En algunos casos, una secuencia codificante de la descripción codifica una proteína que contiene una secuencia señal.

#### Péptidos de señal/Señales de secreción

25 Las secuencias de señal se traducen en marco como un péptido unido, típicamente, al extremo amino-terminal de un polipéptido preferido. Una secuencia señal secretoria causará la secreción del polipéptido de la célula al interactuar con la maquinaria de la célula hospedante. Como parte del proceso secretorio, esta secuencia señal secretoria será escindida típicamente o será escindida al menos parcialmente. El término "secuencia señal" también se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido de señal. En algunos casos, una secuencia señal es heteróloga en comparación con un RdCVF particular.

30 La estructura de un péptido de señal típico puede incluir tres regiones distintas: (i) una región N-terminal que contiene una variedad de aminoácidos con carga positiva (*por ejemplo*, lisinas y argininas); (ii) una región de núcleo hidrófoba, central (región h); (iii) una región de escisión hidrófila (región c) que contiene la configuración de secuencia reconocida por la peptidasa de señal (*por ejemplo*, véase von Heijne, G. (1983) Eur. J. Biochem., 133:17-21; von Heijne, G. (1985) J. Mol. Biol., 184:99-105; von Heijne, G. (1997) Protein Engineering (10):1-6). Los ejemplos de proteínas con péptidos de señal que pueden usarse en la descripción incluyen, pero no están limitados a, la hormona de crecimiento humana (HGH, por sus siglas en inglés), proteína morfogenética ósea 7 (BMP7, por sus siglas en inglés), proteína morfogenética ósea 2 (BMP2, por sus siglas en inglés), factor neurotrófico ciliar (CNTF, por sus siglas en inglés), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1, por sus siglas en inglés),  $\beta$ -glucuronidasa (GUSB), factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), factor inhibitorio de leucemia (LIF, por sus siglas en inglés), proteínas de inmunoglobulina, hormona de crecimiento bovina, proalbúmina bovina, proinsulina humana, interferón-gamma humano, alfa-fibrinógeno humano, cadena pesada de IgG humana, amilasa de rata, alfa-fetoproteína de murino, lisozima de pollo, fosfatasa alcalina, placentaria humana y la proteína rein 22.1 de maíz. Estos péptidos de señal pueden usarse de acuerdo con la descripción. En algunos casos, un péptido de señal utilizado de acuerdo con la descripción se selecciona del grupo que consiste de HGH, BDNF, IGF-1 y GUSB. En algunos casos, el péptido de señal es de una inmunoglobulina tal como una IgK.

50 Una secuencia señal puede ser una secuencia señal de mamífero, murino o humano. En algunos casos, un ácido nucleico o vector de la descripción comprende los nucleótidos 1-105 de la SEQ ID NO:1 o 4-105 de la SEQ ID NO:1. En algunos casos, una secuencia señal codifica una secuencia de aminoácidos que comprende los aminoácidos 2-34 de la SEQ ID NO:2 o comprende la SEQ ID NO:15. Una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de señal puede ser una secuencia de tipo silvestre o puede ser una secuencia recodificada.

55 En algunos casos de la descripción, una secuencia de péptidos de señal se codifica para la N-terminal o C-terminal de un RdCVF. En algunos casos, el péptido de señal dirige el tránsito de la proteína a las rutas secretorias, *por ejemplo*, al retículo endoplásmico (ER, por sus siglas en inglés). En algunos casos, un péptido de señal facilita el transporte de proteínas del citoplasma a destinos fuera de la célula. Las secuencias de péptidos de señal se pueden seleccionar de secuencias de péptidos de señal de origen natural, derivados de las mismas o una secuencia diseñada, sintética. En algunos casos, los parámetros no limitantes para una secuencia de péptidos de señal diseñada incluyen una secuencia de 3-40 residuos, que comprende un núcleo hidrófobo de 3 a 20 residuos flanqueado por varios residuos relativamente hidrófilos.

65 En algunos casos, una secuencia de péptidos de señal carece de un núcleo hidrófobo. Los ejemplos no limitantes de proteínas secretorias de mamífero que carecen de una secuencia señal hidrófoba, típica, que puede usarse en la

descripción incluyen, pero no están limitados a, IL-1 $\alpha$  humana, IL1 $\beta$ , bFGF, aFGF, PDEGF, proteína anticoagulante, lectina L-14, factor derivado de ATL, Factor XIIIa, Ancorina CII, lipocortina I, paratimosina,  $\alpha$ -protimosina y transglutaminasa de roedor, paratimosina y MDGI.

## 5 Ácidos Nucleicos

La descripción incluye ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un RdCVF e incluye vectores que comprenden esos ácidos nucleicos.

10 Para asegurar la expresión local y/o a largo plazo de un ácido nucleico de interés, algunos casos de la descripción contemplan transducir una célula con un ácido nucleico o vector que codifica un RdCVF. La presente descripción no debe interpretarse como limitada a ningún método de suministro de ácido nucleico particular y cualquier vehículo de suministro de ácido nucleico disponible con ya sea una estrategia de suministro de ácido nucleico *in vivo* o *in vitro* o el uso de células manipuladas (tal como la tecnología de Neurotech, Lincoln, RI, *por ejemplo*, véase las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,231,879; 6,262,034; 6,264,941; 6,303,136; 6,322,804; 6,436,427; 6,878,544) así como también ácidos nucleicos de la descripción que codifican el RdCVF per se (*por ejemplo*, "ADN desnudo"), puede usarse en la práctica de la descripción. Varios vehículos de suministro, tales como vectores, pueden usarse con la descripción. Por ejemplo, los vectores virales, lípidos anfifílicos, polímeros catiónicos, tales como polietilimina (PEI) y polilisina, dendrímeros, tales como moléculas de tipo bombazo y moléculas de tipo destello estelar, lípidos no iónicos, lípidos aniónicos, vesículas, liposomas y otros medios de suministro de ácido nucleico sintéticos (*por ejemplo*, véase las Patentes de los Estados Unidos Nos. 6,958,325 y 7,098,030; Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat y otros, en "Liposomes" en "The Therapy of Infectious Disease and Cancer"; y Lopez-Berestein & Fidler (eds.), Liss, Nueva York, páginas 317-327 y 353-365 (1989); los ácidos nucleicos "desnudos" y así por el estilo pueden usarse en la práctica de la presente descripción.

25 En algunos casos, se utiliza una molécula de ácido nucleico en la cual las secuencias codificantes de RdCVF y cualquier otra secuencia deseada son flanqueadas por regiones que promueven la recombinación homóloga en un sitio deseado en el genoma, proporcionando de esta manera una expresión intracromosómica del ácido nucleico de RdCVF (Koller y otros (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 86:8932-8935; Zijlstra y otros (1989) Nature 342:435-438). El suministro de un ácido nucleico en un paciente puede ser ya sea directo, caso en el cual el paciente es expuesto directamente al ácido nucleico o vector que lleva el ácido nucleico, o indirecto, caso en el cual las células son transformadas primero con el ácido nucleico *in vitro*, después son trasplantadas en el paciente.

35 Un vector es un medio por el cual un ácido nucleico de interés (*por ejemplo*, un ácido nucleico terapéutico que puede codificar una proteína terapéutica) se introduce en una célula objetivo de interés. Los métodos para obtener o construir un vector de interés incluyen, pero no están limitados a, técnicas de manipulación de genes estándar, reacciones de secuenciación, digestiones de enzimas de restricción, reacciones de polimerasa, PCR, PCR SOEing, ligaduras, reacciones de recombinasa (*por ejemplo*, la tecnología GATEWAY® de Invitrogen) otras enzimas activas en ácidos nucleicos, materiales y métodos de propagación de bacterias y virus, productos químicos y reactivos, protocolos de mutagénesis dirigida a un sitio y así por el estilo, como se sabe en el campo, véase, por ejemplo, Maniatis y otros texto, "Molecular Cloning".

45 Los ácidos nucleicos de la descripción comprenderán típicamente una secuencia promotora unida de manera operativa a una secuencia codificante de RdCVF. Un promotor puede ser un promotor específico para tejidos, un promotor específico para células, un promotor inducible, un promotor reprimible, un promotor constitutivo, un promotor sintético o un promotor híbrido, por ejemplo. Los ejemplos de promotores útiles en las construcciones de la descripción incluyen, pero no están limitados a, un promotor de fagos lambda (PL); un promotor prematuro de SV40; un promotor viral de herpes simple (HSV, por sus siglas en inglés); un promotor de citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés), tal como el promotor prematuro inmediato de CMV humano; un promotor híbrido con un potenciador de CMV y un promotor de beta-actina de pollo; un sistema promotor sensible a trans-activadores controlado por tetraciclina (tet); un promotor de repeticiones terminales largas (LTR), tal como un MoMLV LTR, BIV LTR o un HIV LTR; un promotor de regiones U3 del virus de sarcoma murino de Moloney; un promotor de Granzyme A; una(s) secuencia(s) reguladora(s) del gen de metalotioneína; un promotor de CD34; un promotor de CD8; un promotor de timidina cinasa (TK); un promotor de parvovirus B19; un promotor de PGK; un promotor de glucocorticoides; un promotor de proteínas de choque de calor (HSP, por sus siglas en inglés), tal como los promotores HSP65 y HSP70; un promotor de inmunoglobulina; un promotor de MMTV; un promotor de virus de sarcoma Rous (RSV, por sus siglas en inglés); un promotor de lac; un promotor de CaMV 35S; y un promotor de nopalina sintetasa. En algunos casos, un promotor es un promotor de MND (Robbins y otros, 1997, J. Virol. 71:9466-9474) o un promotor de MNC, el cual es un derivado del promotor de MND en el cual los potenciadores de LTR se combinan con un promotor de CMV mínimo (Haberman y otros, J. Virol. 74(18):8732-8739, 2000). En algunos casos, una secuencia codificante de RdCVF se une de manera operativa a una secuencia promotora que comprende la secuencia de nucleótidos 150-812 de la SEQ ID NO:11.

65 En algunos casos, un vector o ácido nucleico de la descripción comprende un intrón, unido de manera operativa a una secuencia codificante para una proteína RdCVF. Un intrón puede ser de un gen de RdCVF o puede ser un intrón heterólogo. Los intrones heterólogos son conocidos y los ejemplos no limitantes incluyen un intrón de gen de  $\beta$ -globina humana y un intrón de beta-actina. En algunos casos, una secuencia de intrón es una secuencia de intrón del gen de  $\beta$ -

globina humana. En algunos casos, una secuencia de intrón comprende los nucleótidos 820-1312 de la SEQ ID NO:11 o 908-1307 de la SEQ ID NO:11.

5 En algunos casos, un ácido nucleico de la descripción comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia codificante para una proteína RdCVF, en donde la secuencia codificante de RdCVF comprende una secuencia de nucleótidos recodificada. Un ácido nucleico puede codificar una proteína RdCVF1 y/o una proteína RdCVF2. En algunos casos, una proteína RdCVF es una proteína RdCVF de versión corta. En algunos casos, una proteína RdCVF es una proteína RdCVF de versión larga. Por razones de claridad, una proteína RdCVF puede ser una proteína RdCVF1-corta, RdCVF1-larga, RdCVF2-corta o RdCVF2-larga. En algunos casos, la proteína RdCVF es una proteína RdCVF humana.

10 Típicamente, una región codificante de nucleótidos de mamífero inicia con la secuencia de nucleótidos ATG (codón de metionina inicial), tal como se encuentra en una región codificante de RdCVF humana. Como se plantea en la presente descripción, algunos casos de la descripción proporcionan una región codificante de RdCVF recodificada y en algunos casos adicionales, la región codificante se fusiona, en el marco con una segunda región codificante, *por ejemplo*, una secuencia codificante para una secuencia señal. En algunos de esos casos, la secuencia de nucleótidos de ATG no está necesariamente al inicio de la región codificante de RdCVF, *por ejemplo*, la región codificante de RdCVF inicia mediante la codificación del segundo aminoácido de la proteína RdCVF particular. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos de ATG puede estar al inicio de la región codificante de RdCVF, incluso cuando la región codificante de RdCVF está unida de manera operativa a otra región codificante en dirección 5' con respecto a la región codificante de RdCVF.

15 En algunos casos, un ácido nucleico de la descripción comprende las SEQ ID NO:1, 3 u 11. En algunos casos, un ácido nucleico de la descripción comprende los nucleótidos 150-812, 820-1312 y 1340-2080 de la SEQ ID NO:11. En algunos casos, un ácido nucleico de la descripción comprende los nucleótidos 150-812, 908-1307 y 1340-2080 de la SEQ ID NO:11. En algunos casos, un ácido nucleico comprende además los nucleótidos 2130-2608 de la SEQ ID NO:11.

En algunos casos, un ácido nucleico de la descripción comprende una región codificante para un RdCVF, en donde la secuencia codificante de RdCVF ha sido recodificada.

30 En algunos casos de la descripción, un ácido nucleico de la descripción está en un vector, tal como un vector viral.

#### Vectores Virales

35 La descripción incluye vectores virales que comprenden una región codificante de RdCVF de la descripción. Los ejemplos de vectores virales que son útiles en la presente descripción se describen en la publicación del PCT No. WO08/106644 y la publicación de patente de los Estados Unidos No. US20100120665. En algunos casos, la descripción no está limitada a un vector viral particular. Los vectores virales incluyen, pero no están limitados a, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores adenovirales (véase, *por ejemplo*, patente de los Estados Unidos No. 7,045,344), vectores de AAV (*por ejemplo*, véase la patente de los Estados Unidos No. 7,105,345), vectores virales de Herpes (*por ejemplo*, véase las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,830,727 y 6,040,172), hepatitis (*por ejemplo*, hepatitis D), vectores virales (*por ejemplo*, véase la patente de los Estados Unidos No. 5,225,347), vectores de SV40, vectores de EBV (*por ejemplo*, véase la patente de los Estados Unidos No. 6,521,449) y vectores de virus de la enfermedad de Newcastle (*por ejemplo*, véase las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,146,642, 7,442,379, 7,332,169 y 6,719,979). En algunos casos, un vector lentiviral es un vector de HIV, EIAV, SIV, FIV o BIV. En algunos casos, un vector se selecciona de un vector de AAV o un vector adenoviral. La descripción también proporciona una célula que produce un vector viral de la descripción.

50 Los viriones de vectores de la descripción se pueden administrar *in vivo* o *in vitro* a células (por ejemplo, células de mamífero). Los vectores (virales o no virales) pueden usarse para transducir o transformar células que incluyen, pero no están limitadas a, células no diferenciadas, células diferenciadas, células somáticas, células primitivas y/o células madre. En algunos casos, las células madre se proponen para la administración a un humano y no para el implante en una mujer adecuadamente pseudo-embarazada para la diferenciación y el desarrollo en un bebé.

55 En algunos casos, un vector viral de la descripción comprende un factor acelerador del decaimiento (DAF, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, un vector viral envuelto incluye un DAF en la membrana viral. En algunos casos, un DAF es un DAF de tipo silvestre. En algunos casos, un DAF es parte de una proteína de fusión con una proteína de envoltura, *por ejemplo*, véase Guibinga y otros Mol Ther. 2005 11(4):645-51.

60 El adenovirus es un virus de ADN nuclear, no envuelto, con un genoma típicamente de aproximadamente 36 kb. Los adenovirus humanos se dividen en numerosos serotipos (aproximadamente 47, numerados debidamente y clasificados en 6 grupos: A, B, C, D, E y F).

65 Los vectores adenovirales recombinantes tienen un tropismo para células tanto mitóticas como no mitóticas, potencial patógeno mínimo, capacidad para replicarse en un título alto para la preparación de reservas de vectores y el potencial para llevar insertos de secuencias de nucleótidos relativamente grandes (Berkner, (1992) Curr. Top. Micro. Immunol. 158:39-66; Jolly, (1994) Cancer Gene Therapy 1:51-64). Los vectores adenovirales con supresiones de varias

secuencias de genes adenovirales han sido diseñados como vehículos adecuados para el suministro de ácidos nucleicos a células. En algunos casos, un vector adenoviral de la descripción es un vector adenoviral dependiente de ayudantes o un vector adenoviral "cobarde". Pueden usarse vectores adenovirales que se suprimen en uno o más de los siguientes genes: E1a, E1b, E2a, E2b y E3. Los métodos para conducir el suministro de ácidos nucleicos basado en adenovirus se describen en, *por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,824,544; 5,868,040; 5,871,722; 5,880,102; 5,882,877; 5,885,808; 5,932,210; 5,981,225; 5,994,106; 5,994,132; 5,994,134; y 6,001,557.

Los vectores de AAV se derivan de parvovirus de ADN monocatenario (ss, por sus siglas en inglés). Una partícula de AAV individual puede dar cabida hasta 5 kb de ADNss, dejando aproximadamente 4.5 kb para un transgén y elementos reguladores. Los sistemas de trans-empalme como se describe, por ejemplo en la Patente de los Estados Unidos No. 6,544,785, pueden casi duplicar este límite y estos tipos de vectores también pueden usarse con la descripción. Con respecto a la descripción, puede usarse esencialmente un AAV de cualquier serotipo. En algunos casos de la descripción puede usarse un serotipo de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 o AAV9 (por ejemplo, véase las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,173,414, 5,252,479, 5,552,311, 5,658,776, 5,658,785, 5,763,416, 5,773,289, 5,843,742, 5,869,040, 5,942,496, 5,948,675, 6,001,650 y 7,790,449; publicación del PCT No. WO2009134681; Kassim y otros, PLoS ONE (2010) 5(10)e13424: 1-10; Kotin, Hum Mol Genet (2011) 20(R1):R2-6), aunque la descripción no está limitada a esos serotipos (véase, por ejemplo, Gao y otros (2002) PNAS 99:11854-11859; y Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003).

Un vector de AAV de la descripción también puede ser pseudotipificado. Los vectores de AAV pseudotipificados contienen el genoma de un serotipo de AAV en la cápside de un segundo serotipo de AAV (por ejemplo, véase Auricchio y otros, (2001) Hum. Mol. Genet., 10(26):3075-81). Un vector de AAV de la descripción puede contener una cápside mutada y/o puede ser fijado como objetivo nuevamente. Por ejemplo, véase Grieger y otros (Adv Biochem Eng Biotechnol. (2005) 99:119-45); Gonçalves y otros (Mol Ther. (2006) 13(5):976-86); y Warrington y otros (J Virol. (2004) 78(12):6595-609).

En algunos casos de la descripción, un vector de AAV se reviste con polímeros, *por ejemplo*, polímeros reactivos para reducir el tropismo natural o la unión natural del vector de AAV; para redirigir el vector de AAV y/o para proporcionar resistencia a antiseros neutralizantes. Por ejemplo, véase Carlisle y otros (J Gene Med. (2008) 10(4):400-11).

Los retrovirus son virus de ARN en donde el genoma viral es ARN. Cuando una célula hospedante se infecta con un retrovirus, el ARN genómico se transcribe de manera inversa en un producto intermedio de ADN el cual se integra eficientemente en el ADN cromosómico de células infectadas. Los lentivirus contienen otros genes con una función reguladora o estructural. El uso de vectores retrovirales para el suministro de genes se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 6,013,516; y Patente de los Estados Unidos No. 5,994,136. Los ejemplos de sistemas BIV se describen, por ejemplo, en Matukonis y otros, 2002 Hum. Gene Ther. 13, 1293-1303; Molina y otros, 2002 Virology. 304, 10-23; Molina y otros, 2004 Hum. Gene Ther., 15, 65-877; patentes de los Estados Unidos Nos. 6,864,085, 7,125,712, 7,153,512; publicación del PCT No. WO08/106644 y publicación de Patente de los Estados Unidos No. US20100120665.

Un vector viral de ADN es un vector viral basado en o derivado de un virus que tiene un genoma basado en el ADN. Un vector viral de virus no envuelto es un vector viral basado en o derivado de un virus que carece de una membrana de bicapa lipídica.

En algunos casos, un vector viral de la descripción es un vector de AAV. En algunos casos, un vector viral de la descripción no es un vector viral de inmunodeficiencia de bovino o no es un vector lentiviral. En algunos casos, un vector viral se selecciona del grupo que consiste de un vector viral de ADN, un vector viral no envuelto y un vector adenoviral.

Suministro Celular de RdCVF, que incluye células encapsuladas

Otro enfoque para la terapia génica o el suministro de proteínas implica la transferencia de un gen a células *in vitro* o *ex vivo* y después la administración de las células a un mamífero o paciente. La transferencia de un ácido nucleico a células puede ser por medio de cualquier método, tal como la transfección, microinyección, electroporación, fusión celular, transferencia de genes mediada por cromosomas, transferencia de genes mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, lipofección, bombardeo de micropartículas, transfección mediada por fosfato de calcio, transducción de vectores virales o bacteriófago y así por el estilo. Opcionalmente, un marcador seleccionable también se puede introducir en las células. Si se utiliza un marcador seleccionable, las células entonces se pueden colocar bajo selección, *por ejemplo*, para incrementar la expresión y/o para aislar/seleccionar aquellas células que expresan la región codificante transfectada (véase, por ejemplo, Loeffler & Behr, Meth. Enzymol. 217:599-618 (1993); Cohen y otros, Meth. Enzymol. 217:618-644 (1993); y Cline, Pharmac. Ther. 29:69-92 (1985)). Esas células entonces se pueden suministrar a un paciente directamente o después del encapsulamiento.

En algunos casos, un ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración *in vivo* de la célula recombinante resultante. En algunos casos, una técnica puede proporcionar la transferencia estable del ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico sea expresable por la célula y en algunos casos heredable y expresable por su

progenie de células. Las células recombinantes se pueden suministrar a un paciente por medio de varios métodos. En algunos casos, una proteína RdCVF se expresa de una célula por *vía* de un promotor regulable, inducible y/o reprimible.

5 En algunos casos, una célula utilizada es autóloga, alogénica o xenogénica con respecto a un paciente. En algunos casos, las células autólogas se manipulan *ex vivo* para causar que contengan un ácido nucleico de la descripción lo cual permite que la célula produzca o secrete una proteína RdCVF y las células se introducen nuevamente al paciente.

10 En algunos casos, las células se administran localmente (*por ejemplo*, en una articulación, de manera intravítrea, intrarretiniana, intracraneal, etcétera) o sistémicamente (*por ejemplo*, i.v.).

15 En algunos casos, las células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre y/o progenitoras hematopoyéticas) se administran por la ruta intravenosa. En algunos casos, las células de los ojos y/o las células pluripotenciales se pueden inyectar directamente en el ojo.

20 Una célula madre y/o progenitora la cual se puede aislar y mantener *in vitro* puede usarse potencialmente de acuerdo con algunos casos de la descripción. Estas células madre incluyen, pero no están limitadas a, células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés), células madre de tejidos epiteliales tal como la piel y el recubrimiento del intestino, células de músculo cardíaco embrionario, células madre hepáticas (*véase, por ejemplo*, el documento WO 94/08598) y células madre neurales (*por ejemplo*, Stemple y Anderson (1992) Cell 71:973-985). En algunos casos, la célula administrada es una célula madre que comprende un ácido nucleico de la descripción y es capaz de expresar y secretar un RdCVF.

25 Las células encapsuladas pueden permitir el suministro controlado y/o continuo de una proteína, tal como un RdCVF, *in vivo*. En algunos casos, las células que comprenden un ácido nucleico de la descripción y que expresan y/o secretan un RdCVF se encapsulan. En algunos casos, las células se encapsulan dentro de una membrana semipermeable que permite la difusión del RdCVF a través de la membrana. Más información relacionada con células encapsuladas e implantes de células encapsuladas se encuentra en Sieving y otros (Proc Natl Acad Sci EUA, (2006) 103(10):3896-901); patentes de los Estados Unidos Nos. 7,115,257 y 7,820,195; y publicación del PCT No. WO2011044216. En algunos casos de la descripción, las células encapsuladas que expresan una proteína RdCVF se suministran a un animal.

30 En algunos casos, las células encapsuladas se implantan en un mamífero, por ejemplo, se implantan en el ojo, cerebro o región olfativa. En algunos casos, las células encapsuladas son células epiteliales, pigmentarias, retinianas, por ejemplo, ARPE-19 (disponibles de ATCC, Manassas, VA). En algunos casos, las células encapsuladas se utilizan para suministrar el RdCVF al ojo, por ejemplo, a la parte posterior del ojo.

35 En algunos casos, un implante de células encapsuladas de la descripción está comprendido de células que son encapsuladas en una sección de una membrana de fibras huecas semipermeable y las células han sido modificadas genéticamente para producir un RdCVF. En algunos casos, un implante de células encapsuladas tiene un bucle de sutura en un extremo para fijarlo a la esclerótica en el cuerpo vítreo-retiniano dentro del ojo. En algunos casos, un implante de células encapsuladas es de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mm de longitud.

#### Secreción y producción de proteínas RdCVF

45 Los ácidos nucleicos y vectores virales de la descripción pueden usarse para expresar, producir y/o secretar un RdCVF a partir de una célula. Esta expresión, producción y/o secreción pueden ocurrir *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

50 Algunos casos de la descripción proporcionan métodos para secretar una proteína RdCVF a partir de una célula que comprenden administrar a la célula un ácido nucleico y/o un vector viral de la descripción. En algunos casos, la célula puede ser una célula de mamífero, una célula humana, una célula ocular, una célula epitelial, pigmentaria, retiniana (RPE), una célula de bastón o una célula de cono.

55 Algunos casos de la descripción usan células de vertebrados o mamíferos. Los ejemplos de líneas de células hospedantes de mamíferos útiles son la línea de células CVI de riñón de mono transformada por SV40 (por ejemplo, COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (por ejemplo, células 293 o 293T que incluyen ya sea la línea de células subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y otros, J. Gen Virol. 36:59 (1977) tales como 293 Freestyle (Invitrogen, Carlsbad, CA) o 293FT; células de riñón de hámster bebé (por ejemplo, BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino (células CHO); células de ovario de hámster chino/DHFR (por ejemplo, CHO, Urlaub y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células Sertoli de ratón (por ejemplo, TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (por ejemplo, CVI ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (por ejemplo, VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humanas (por ejemplo, HELA, ATCC CCL 2); células de riñón de canino (por ejemplo, MOCK, ATCC CCL 34); células CF2TH; células de hígado de rata búfalo (por ejemplo, BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humanas (por ejemplo, W138, ATCC CCL 75); células de hígado humanas (por ejemplo, Hep G2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (por ejemplo, MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y otros, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1983)); células 65 MRC 5; células ARPE-19 (ATCC) y células FS4.

En algunos casos, una célula se selecciona del grupo que consiste de una célula 293, célula CHO, célula PerC6, célula Vero, célula BHK, célula HeLa, célula COS, célula MDCK, célula 3T3 o WI38.

5 Algunos casos de la descripción proporcionan una célula aislada que comprende un ácido nucleico de la descripción. En algunos casos, el ácido nucleico se integra en el genoma celular/ADN.

10 La descripción también incluye métodos para producir una proteína RdCVF que comprenden cultivar una célula bajo condiciones que permiten la expresión y secreción de la proteína RdCVF y el aislamiento de la proteína RdCVF del cultivo de células, en donde la célula comprende un ácido nucleico de la descripción que codifica y permite la expresión de la proteína RdCVF, por ejemplo, la secreción de una proteína RdCVF. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una secuencia codificante para una proteína RdCVF, en donde la secuencia codificante de RdCVF comprende una secuencia recodificada. La proteína RdCVF puede ser una proteína RdCVF 1 o 2 o puede ser la forma larga o corta. En algunos casos, esos métodos comprenden además la purificación de la proteína RdCVF a partir de la célula y/o sobrenadante del cultivo.

15 La descripción también incluye una proteína RdCVF expresada por una célula de un ácido nucleico de la descripción. La descripción también proporciona formas secretadas de proteínas RdCVF de la descripción y composiciones que comprenden una proteína RdCVF secretada de la descripción.

20 En algunos casos, una proteína RdCVF expresada a partir de una célula se purifica a al menos 90 %, al menos 93 %, al menos 95 %, al menos 98 %, al menos 99,5 % o al menos 99,9 % pura en relación con la proteína total.

Composiciones, formulaciones y preparaciones

25 Algunos casos de la descripción proporcionan composiciones, formulaciones o preparaciones, por ejemplo composiciones farmacéuticas, que contienen un ácido nucleico de la descripción, un vector de la descripción, una proteína RdCVF de la descripción o cualquier combinación de los mismos.

30 Las formulaciones (por ejemplo, para inyección) son en general, pero no necesariamente, soluciones biocompatibles del ingrediente activo, por ejemplo, que comprenden solución de Hank, solución de Ringer o solución salina tamponada con fosfato. En algunos casos, una formulación o composición farmacéutica comprende uno o más de los siguientes: citrato, NaCl, cloruro de potasio (KCl), dihidrato de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), hexahidrato de cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), trihidrato de acetato de sodio ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), dihidrato de citrato de sodio ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sacarosa, hidróxido de sodio y/o ácido clorhídrico (para ajustar el pH) y agua. La lista anterior incluye algunas moléculas que se listan como hidratos particulares, por ejemplo, dihidrato, trihidrato, hexahidrato, etcétera. Se entiende que varios hidratos de esos compuestos pueden usarse en la descripción y la descripción no está limitada a esas formas de hidrato particulares de las moléculas listadas. En algunos casos, una formulación o composición farmacéutica comprende uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste de histidina,  $\text{MgCl}_2$ , trehalosa, un polisorbato, polisorbato 20, NaCl, sacarosa, arginina y prolina. En algunos casos, una formulación comprende uno o más de los siguientes: histidina; deshidrato de  $\alpha, \alpha$ -trehalosa;  $\text{MgCl}_2$ ; un polisorbato tal como polisorbato 20; y NaCl. En algunos casos, una formulación o composición farmacéutica comprende uno o más de los siguientes: solución salina tamponada con fosfato (PBS) y pluronic F-68. En algunos casos, la concentración de pluronic F-68 puede ser de 0,0001 %, 0,001 %, 0,005 %, 0,01 % o 0,1 %.

45 Los ejemplos de formulaciones adecuadas y métodos de formulación para un modo deseado de administración se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, la última edición, Mack Publishing Co., Easton, PA y en la patente de los Estados Unidos No. 7,208,577.

50 En algunos casos, una composición para el uso *in vivo* contiene un "portador" o un "portador farmacéuticamente aceptable". El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra el ácido nucleico, vector o proteína de la descripción. El término "portador" incluye, pero no está limitado a, un material ya sea sólido o líquido, el cual puede ser orgánico o inorgánico y de origen sintético o natural, con el cual un(unos) componente(s) activo(s) de la composición se mezcla o se formula para facilitar la administración a un sujeto. Cualquier otro material empleado usualmente en la formulación de un producto farmacéutico es adecuado. Los portadores farmacéuticos pueden diferir de soluciones y suspensiones típicas debido a que se preparan específicamente para el uso *in vivo* para excluir sustancias que pueden ser dañinas para el hospedante a quien se administra la composición (por ejemplo, remoción de toxinas bacterianas).

60 Los ejemplos de portadores líquidos adecuados incluyen agua y soluciones acuosas que contienen compuestos orgánicos oxigenados tal como etanol. Los tampones y otros materiales que están presentes normalmente en preparaciones farmacéuticas, tal como agentes saborizantes y de suspensión, también pueden estar presentes. En general, un(unos) aceite(s) adecuado(s), solución salina, dextrosa acuosa, (glucosa) y soluciones de azúcar relacionadas y glicoles tales como propilenglicol o polietilenglicoles son portadores adecuados típicamente para soluciones parenterales. En algunos casos, las soluciones para la administración parenteral contienen una sal soluble en agua del ingrediente activo, agentes estabilizadores adecuados y si es deseable o necesario, sustancias tampón. Los agentes antioxidantes tales como bisulfito de sodio, sulfito de sodio, o ácido ascórbico, ya sea solos o en combinación,

pueden usarse como agentes estabilizantes. También se utiliza ácido cítrico y sus sales y EDTA sódico. Además, las soluciones parenterales pueden contener conservadores, tal como cloruro de benzalconio, metil- o propil-parabeno y clorobutanol.

- 5 Los portadores pueden incluir carbohidratos tales como trehalosa, manitol, glutatona, xilitol, sacarosa, lactosa y sorbitol. Otros ingredientes para el uso en formulaciones pueden incluir, por ejemplo, DPPC (1,2-Didecanoil-*sn*-glicero-3-fosfolina), DOPE (1,2-Dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina), DSPC (1,2-Diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfolina), 1,2-Diestearoil-*sn*-glicero-3-fosfolina) y DOPC (1,2-Dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfolina). Pueden usarse surfactantes naturales o sintéticos. Puede usarse polietilenglicol (incluso además de su uso en la derivatización de una proteína).
- 10 Pueden usarse dextranos, tal como ciclodextrano. En algunos casos, puede usarse ciclodextrina, aminas terciarias y/o beta-ciclodextrina. Pueden usarse sales biliares y otros potenciadores relacionados. Puede usarse celulosa y derivados de celulosa. Pueden usarse aminoácidos, tal como se usa en una formulación tampón. También, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, la inclusión de complejos u otros tipos de portadores.
- 15 Una composición, si se desea también puede contener agentes de humedecimiento y/o emulsionantes y/o agentes tampones del pH. Donde sea necesario, una composición también puede incluir un agente solubilizante y/o un anestésico local tal como lignocaina para aliviar el dolor en el sitio de la inyección.

20 En algunos casos, una preparación o composición farmacéutica de la descripción comprende (i) un portador farmacéuticamente aceptable y (ii) un ácido nucleico de la descripción, un vector viral de la descripción, una proteína RdCVF de la descripción o cualquier combinación de los mismos.

#### Administración, suministro y tratamiento

- 25 Se entiende que cuando se plantea la introducción o administración de un ácido nucleico o vector que codifica una proteína RdCVF, la descripción también contempla la introducción o administración de la proteína RdCVF misma. Se entiende que cuando se plantea la introducción de una proteína RdCVF, la descripción también contempla la introducción de un ácido nucleico o vector que codifica una proteína RdCVF.
- 30 En algunos casos, las composiciones de la descripción se pueden administrar local o sistémicamente. Las rutas de administración útiles se describen en la presente descripción y son conocidas en el campo. Los métodos de introducción o administración incluyen, pero no están limitados a, la ruta intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, intratraqueal, tópica, inhalada, transdérmica, rectal, rutas parenterales, epidural, intracraneal, en el cerebro, intraventricular, subdural, intraarticular, intratecal, intracardiaca, intracoronaria, intravítrea, subretiniana, en la cámara intraanterior del ojo, localmente en la córnea, subconjuntiva, inyección subtenon, mediante la aplicación de colirio, rutas orales, por vía de un catéter de balón, por vía de una endoprótesis o cualquier combinación de los mismos. La administración sistémica puede ser, pero no está limitada a, por medio de una inyección intravenosa o intra-arterial o por medio del suministro transmucosa, subcutáneo, transdérmico y/o intraperitoneal.
- 40 En algunos casos, por ejemplo, que comprenden la administración a los ojos, un vector o ácido nucleico que codifica el RdCVF de la descripción se administra aproximadamente una vez cada semana, un mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, un año, 18 meses, 2 años, 30 meses, 3 años, 5 años, 10 años o como sea necesario. En algunos casos, por ejemplo, que comprenden la administración a los ojos, un vector o ácido nucleico que codifica el RdCVF de la descripción se administra desde aproximadamente cada 1 a 4 semanas, aproximadamente cada 4 a 8 semanas,
- 45 aproximadamente cada 1 a 4 meses, aproximadamente cada 3 a 6 meses, aproximadamente cada 4 a 8 meses, aproximadamente cada 6 a 12 meses, aproximadamente cada 9 a 15 meses, aproximadamente cada 12 a 18 meses, aproximadamente cada 15 a 21 meses, aproximadamente cada 18 a 24 meses, aproximadamente cada 1 a 2 años, aproximadamente cada 1.5 a 3 años, aproximadamente cada 2 a 4 años, aproximadamente cada 3 a 5 años, aproximadamente cada 5 a 7 años, aproximadamente cada 7 a 10 años o aproximadamente cada 10 a 20 años. Se espera que la administración de un vector que codifica una proteína RdCVF sería menos frecuente que la administración de la proteína RdCVF misma. En algunos casos de la descripción, una preparación farmacéutica comprende un vector que codifica una proteína RdCVF de la descripción y la preparación farmacéutica se administra solo una vez al paciente.
- 50
- 55 En algunos casos, una proteína RdCVF de la descripción se administra por medio de una inyección intravítrea o subretiniana a un ojo humano. En algunos casos, de aproximadamente 15 µg a aproximadamente 5 mg; de aproximadamente 15 µg a aproximadamente 500 µg; de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 900 µg; de aproximadamente 300 µg a aproximadamente 700 µg; de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 1 mg; de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 5 mg; aproximadamente 1 mg; o aproximadamente 500 µg de una proteína RdCVF se administra por medio de una inyección intravítrea o subretiniana a un ojo humano.
- 60

65 En algunos casos, una proteína RdCVF se administra por medio de una inyección subretiniana o una inyección intravítrea de un vector de AAV que codifica RdCVF. En algunos casos, de aproximadamente  $5 \times 10^8$  a aproximadamente  $1 \times 10^9$ ; de aproximadamente  $5 \times 10^8$  a aproximadamente  $7,5 \times 10^8$ ; de aproximadamente  $7,5 \times 10^8$  a aproximadamente  $1 \times 10^9$ ; de aproximadamente  $6 \times 10^8$  a aproximadamente  $9 \times 10^8$ ; de aproximadamente  $7 \times 10^8$  a aproximadamente  $8 \times 10^8$ ; aproximadamente  $5 \times 10^8$ ; aproximadamente  $6 \times 10^8$ ; aproximadamente  $7 \times 10^8$ ; aproximadamente  $8 \times 10^8$ ; aproximadamente

9x10<sup>8</sup>; o aproximadamente 1x10<sup>9</sup> número de copias del genoma del vector (GC) de un vector de AAV se administra por medio de una inyección subretiniana. En algunos casos, de aproximadamente 5x10<sup>8</sup> a aproximadamente 1x10<sup>10</sup>; de aproximadamente 5x10<sup>8</sup> a aproximadamente 5x10<sup>9</sup>; de aproximadamente 5x10<sup>8</sup> a aproximadamente 2x10<sup>9</sup>; de aproximadamente 2x10<sup>9</sup> a aproximadamente 5x10<sup>9</sup>; de aproximadamente 5x10<sup>9</sup> a aproximadamente 1x10<sup>10</sup>; de aproximadamente 5x10<sup>8</sup> a aproximadamente 1x10<sup>9</sup>; de aproximadamente 1x10<sup>9</sup> a aproximadamente 3x10<sup>9</sup>; de aproximadamente 3x10<sup>9</sup> a aproximadamente 6x10<sup>9</sup>; de aproximadamente 6x10<sup>9</sup> a aproximadamente 1x10<sup>10</sup>; de aproximadamente 1x10<sup>9</sup> a aproximadamente 1x10<sup>10</sup>; de aproximadamente 1x10<sup>10</sup> a aproximadamente 1x10<sup>11</sup>; o de 1x10<sup>11</sup> a aproximadamente 1x10<sup>12</sup> GC de un vector de AAV se administra por medio de una inyección intravítrea. Se entiende que la cantidad de vector de AAV se mide algunas veces en unidades de transducción o en número de GC. Los números de GC son típicamente entre 25-300 veces más altos que cuando la misma muestra de vector de AAV se mide para unidades de transducción.

En algunos casos, un fármaco antiinflamatorio se puede suministrar en combinación con una proteína RdCVF, un vector o un ácido nucleico de la descripción. Un fármaco antiinflamatorio se puede suministrar antes de, concurrentemente con y/o después de la administración de una molécula o vector de la descripción. En algunos casos, un fármaco antiinflamatorio se administra en la misma solución y/o la misma jeringa que una proteína RdCVF, ácido nucleico o vector de la descripción. En algunos casos, una proteína RdCVF, ácido nucleico o vector de la descripción y un fármaco antiinflamatorio se coadministran al ojo.

Muchos fármacos antiinflamatorios son conocidos en el campo e incluyen, pero no están limitados a, dexametasona, metasulfobenzoato de dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, fluorometolona, bromfenac, pranoprofeno, emulsión oftálmica de ciclosporina (por ejemplo, RESTASIS™), naproxeno, glucocorticoides, ketorolaco, ibuprofeno, tolmetina, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, fármacos anti-inflamatorios esteroideos, diclofenaco, flurbiprofeno, indometacina y suprofeno.

Algunos casos de la descripción incluyen la administración de tanto una proteína RdCVF como un vector que la codifica. Una proteína RdCVF se puede suministrar antes de, concurrentemente con y/o después de la administración de un vector de la descripción. En algunos casos, una proteína RdCVF se administra en la misma solución y/o la misma jeringa que un vector de la descripción. En algunos casos, un vector de la descripción y una proteína RdCVF se coadministran al ojo.

En algunos casos de la descripción, un sistema de suministro de genes puede dar por resultado la transducción y/o integración estable de un gen o región codificante para una proteína RdCVF en una célula objetivo. En algunos casos, las células objetivo son células de mamífero tal como células de primate o células humanas. En algunos casos, las células objetivo son células de los ojos, tal como células epiteliales, pigmentarias, retinianas, células fotorreceptoras de bastones, células fotorreceptoras de conos, células bipolares, células horizontales, células amacrinias, células ganglionares, células retinianas o células pluripotenciales. Las células objetivo pueden estar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En algunos casos, una célula objetivo es una célula madre. Las células madre incluyen, pero no están limitadas a, células madre pluripotentes, células madre totipotentes, células madre hematopoyéticas, células madre cancerosas y células madre embrionarias. En algunos casos, las células pluripotenciales que están contempladas en la presente descripción no son aquellas para propagar una entidad viva de un cigoto o un blastómero. La presente descripción también contempla el uso de una célula parcialmente no diferenciada para el implante en el ojo de un paciente necesitado de tratamiento, por ejemplo, para regenerar células del ojo.

La descripción también proporciona métodos de tratamiento. En algunos casos, la descripción proporciona métodos para conservar células de bastones oculares que comprenden administrar al ojo de un mamífero un ácido nucleico de la descripción, un vector viral de la descripción, una proteína RdCVF de la descripción, una composición farmacéutica de la descripción o una combinación de los mismos. En algunos casos, un vector viral y/o ácido nucleico de la descripción se administra por medio de una inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección a la cámara intraanterior del ojo, inyección subconjuntiva, inyección subtenon o cualquier combinación de las mismas. En algunos casos, se trata un humano. En algunos casos, el mamífero que es tratado padece de una enfermedad ocular seleccionada del grupo que consiste de distrofia retiniana, enfermedad de Stargardt, retinitis pigmentaria, degeneración macular seca relacionada con la edad (AMD seca), atrofia geográfica (etapa avanzada de AMD seca), degeneración macular húmeda relacionada con la edad (AMD húmeda), glaucoma/hipertensión ocular, retinopatía diabética, síndrome de Bardet-Biedel, síndrome de Bassen-Kornzweig, enfermedad de Best, coroidema, atrofia girata, amaurosis congénita, síndrome de Refsum, síndrome de Usher, enfermedad ocular relacionada con la tiroides, enfermedad de Grave, una enfermedad asociada con células epiteliales, pigmentadas, retinianas, enfermedad del segmento anterior, enfermedad de las lentes/cataratas, trastorno de cápsula ocular o uveítis. En algunos casos, la célula de bastón ocular, conservada no contiene un ácido nucleico y/o vector viral de la descripción. Por ejemplo, la célula ocular conservada no es conservada a través de la transducción de la célula ocular conservada misma.

Algunos casos de la descripción, proporcionan un método para conservar células de bastones oculares que comprende administrar al ojo de un mamífero un ácido nucleico y/o vector viral de la descripción, en donde el ácido nucleico y/o el vector viral se administra por medio de una inyección subretiniana y las células de bastones y/o células de conos se conservan en un sitio al menos 1 mm, al menos 2 mm, al menos 3 mm, al menos 5 mm, al menos 7 mm, al menos 10 mm, al menos 15 mm, al menos 20 mm o al menos 25 mm del sitio de la inyección subretiniana. Por ejemplo y sin

desea ser limitado a teoría alguna, las células traducidas con el ácido nucleico o vector viral en el sitio de inyección subretiniana expresan y/o secretan una proteína RdCVF-largo y/o RdCVF-corto la cual puede proporcionar un efecto de conservación de bastones y/o conos oculares en un sitio distante a la célula transducida o sitio de inyección.

5 Además de su expresión en el ojo, la proteína RdCVF también es expresada naturalmente en otros tejidos. Utilizando un planteamiento de proteómica, 90 proteínas se encontraron intactas con RdCVFL que incluía la proteína de unión a microtúbulos tau (Fridlich y otros Mol Cell Proteomics (2009) 8(6):1206-1218). Fridlich y otros demostraron que el nivel de fosforilación de TAU se incrementa en la retina de los ratones *Nxn11<sup>-/-</sup>* (RdCVF1<sup>-/-</sup>) ya que es hiperfosforilada en el cerebro de pacientes que padecen de la enfermedad de Alzheimer, presumiblemente en algunos casos a través del estrés oxidante. Fridlich y otros también mostraron que el RdCVFL inhibe la fosforilación de TAU. Cronin y otros (Cell Death and Differentiation (2010) 17:1199-1210) encontraron que las retinas de *Nxn11<sup>-/-</sup>* (RdCVF1<sup>-/-</sup>) contenían la proteína TAU agregada, como se encuentra en el cerebro de pacientes que padecen de la enfermedad de Alzheimer.

15 Los ratones que carecen del RdCVF2 tienen una visión y olfato deteriorados. Los ratones normales expresan el RdCVF2 en el epitelio olfativo. Jaillard y otros (Encuentro de ARVO (2009) programa#póster# 491/D636) informaron que se descubrió que las neuronas olfativas sobreviven a una tasa más alta cuando se cultivan en presencia del RdCVF2. Jaillard y otros también compararon ratones *RdCVF2<sup>-/-</sup>* con ratones de control, al realizar pruebas de aprendizaje de discriminación olfativa. Por 12 meses de edad, los ratones *RdCVF2<sup>-/-</sup>* no lograron responder correctamente al estímulo.

20 Las proteínas RdCVF tienen actividad neuroprotectora y no solo son un factor para la supervivencia de conos y/o bastones, sino que son factores de supervivencia de neuronas generales.

25 Por lo tanto con base en lo anterior, un ácido nucleico que codifica el RdCVF, un vector viral o una proteína RdCVF de la descripción pueden usarse para tratar o mejorar la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y enfermedades olfativas.

30 La descripción incluye métodos para tratar una enfermedad que comprenden administrar a un mamífero un ácido nucleico de la descripción, un vector viral de la descripción, una proteína RdCVF de la descripción, una composición farmacéutica de la descripción o una combinación de los mismos, en donde la enfermedad se selecciona del grupo que consiste de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y una enfermedad olfativa. En algunos casos, el vector viral de esta descripción es un vector de AAV.

35 **Ejemplos**

La invención ahora se describe con referencia a los siguientes ejemplos. Esos ejemplos se proporcionan solamente con el fin de ilustración y de ninguna manera deberá interpretarse que la invención está limitada a esos ejemplos sino que deberá interpretarse que comprende cualquiera y la totalidad de variaciones las cuales se vuelven evidentes como resultado de las enseñanzas proporcionadas en la presente descripción.

40 Mientras tanto, los casos particulares de la descripción han sido descritas en la presente descripción con fines de descripción, los expertos en la técnica apreciarán que pueden realizarse numerosas variaciones de los detalles sin apartarse de la descripción como se describe en la presente descripción.

45 **Ejemplo 1 - Secuencias codificantes recodificadas para las formas larga y corta de RdCVF1**

Se diseñaron la regiones codificantes de nucleótidos de RdCVF1S y RdCVF1L humanas recodificadas (por ejemplo, nucleótidos 106-741 de la SEQ ID NO:1, nucleótidos 106-744 de la SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:12 o 14). GENEART® (Regensburg, Alemania) se sintetizó secuencias de ácidos nucleicos que, entre otras cosas, contenían secuencias codificantes de nucleótidos optimizadas con codones para RdCVF1S y RdCVF1L. Estas secuencias codificantes también se recodificaron para minimizar las configuraciones tal como configuraciones inhibitorias de procariotas, sitios donadores de empalmes consensuales y sitios donadores de empalmes crípticos.

55 La recodificación de una secuencia codificante de RdCVF1L humana también proporcionó una región codificante de RdCVF1S recodificada, nucleótidos 1-327 de la SEQ ID NO:12 con un codón de parada en el extremo 3'.

Alineamiento de una región codificante de RdCVF1L nativa a una región codificante recodificada

60	RdCVF1L (1-639):	Identities = 529/639 (82,8 %) 89/213 codones diferentes (41,7 %)
	RdCVF1S (1-327):	Identities = 274/327 (83,8 %) 44/109 codones diferentes (40,4 %)
	RdCVF1S (1-327 & TGA)	Identities = 277/330 (83,9 %) 44/110 codones diferentes (40,0 %)

65





Los plásmidos pAAV-LRd268, pHELPER (Cell BioLabs, No. de Catálogo 340202) y pRC2 (Cell BioLabs, No. de Catálogo 340201) se transformaron en células bacterianas competentes DH10B (Invitrogen, No. de Catálogo 18297-010) y se mejoraron con el uso del Equipo Qiagen EndoFree Plasmid Maxi o el Equipo EndoFree Plasmid Mega de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de plásmidos se determinaron con el uso del espectrofotómetro Beckman DU-600. Cada identidad de plásmido se confirmó por medio de digestiones de restricción y análisis.

Para producir el vector rAAV-RdCVF1L, las células 293AAV (Cell BioLabs, No. de Catálogo AAV-100) se sembraron en una cantidad de 4 millones de células por disco de 15 cm en cDMEM (DMEM complementado con 10 % de FBS, 1 % de Glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales y 1 % de Penicilina/Estreptomicina). Al siguiente día, el medio se reemplazó por 25 mL de cDMEM nuevo. Dos horas después se realizó la transfección. Se mezcló agua (57.4 mL) con 1,3 mg de pHELPER, 650 µg de pRC2, 650 µg de pAAV-LRd268 y 8,1 mL de CaCl<sub>2</sub> 2 M (mezcla de agua/plásmido/CaCl<sub>2</sub>). Un volumen de 12,5 mL de 2xHBS (Lonza, Sku:RR07005) se transfirió en cada uno de cinco tubos cónicos de 50 mL. Mientras se remolineaba, 12,5 mL de la mezcla de agua/plásmido/CaCl<sub>2</sub> se añadieron lentamente a cada uno de los tubos cónicos que contenían 2xHBS. Después de una incubación durante 5 minutos, 2.5 mL de la suspensión se añadieron a cada disco de cultivo de células que contenía las células 293AAV.

Al siguiente día, el medio se reemplazó por 25 mL de medio cDMEM nuevo por disco. Dos días después, las células se recolectaron con el uso de un filtro de células y la mezcla de células/medio se transfirió en tubos cónicos de 250 mL. Las muestras se centrifugaron a 3,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante se desechó y las sedimentos celulares se resuspendieron en 110 mL de DMEM. Las muestras de células resuspendidas se separaron en alícuotas (30 mL) en tubos cónicos de 50 mL y un paso de congelamiento/descongelamiento/congelamiento se realizó con el uso de un baño de etanol/hielo seco y un baño de agua a 37 °C. Los tubos se almacenaron a -80 °C hasta el proceso adicional del material. El mismo proceso se empleó para producir rAAV-GFP, sustituyendo el plásmido pAAV-LRd268 por el plásmido pAAV-GFP (Cell BioLabs No. de Catálogo AAV-400).

Para purificar el vector rAAV-RdCVF1L, cuatro tubos cónicos de 50 mL que contenían el vector del paso de congelamiento/descongelamiento/congelamiento se descongelaron a 37 °C en un baño de agua. Cuarenta microlitros de BENZONASE® (Sigma, No. de Catálogo E8263-25kU) se añadieron a cada tubo el cual después se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm y los sobrenadantes se transfirieron en una botella de 500 mL. Se añadieron seis mililitros de una solución de desoxicolato de sodio al 10 % (8,2 g en 82 mL de agua). La muestra se mezcló brevemente y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. La suspensión se filtró con el uso de filtros de 5 µm. Subsecuentemente, se realizó otro paso de filtración con el uso de filtros de 0,8 µm. Una columna de heparina-agarosa (8 mL) (Sigma, No. de Catálogo H6508-25 mL) se preparó y la columna se equilibró con 48 mL de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Invitrogen, No. de Catálogo 10010-049). El lisado celular filtrado se cargó en la columna y la columna se lavó con 40 mL de tampón de lavado (20 mL de NaCl 5 M, 980 mL de PBS). El vector se eluyó con el uso de un tampón de elución de 15 mL (80 mL de NaCl 5 M, 920 mL de PBS) y se recolectó en un tubo cónico de 50 mL nuevo.

El vector se concentró por medio de la filtración en centrifuga. Una unidad de filtración en centrifuga Amicon Ultra-15 (Millipore, No. de Catálogo UFC910024) se enjuagó una vez con PBS y la muestra eluida se añadió al dispositivo. La centrifugación se realizó en una centrifuga Beckman Allegro 6KR a 2200 rpm, 22 °C, hasta que la muestra se concentró a un volumen de 1-2 mL. Un volumen de 15 mL de PBS se añadió y la centrifugación se repitió hasta que el volumen de la muestra fue ≤ 1 mL. El vector purificado se recolectó y las paredes del filtro se enjuagaron con 100 µL de PBS. La muestra se mezcló y las alícuotas de 30 µL del vector se almacenaron a -80 °C en tubos cónicos de 600 µL hasta su uso.

Este proceso se repitió para purificar el vector rAAV-GFP.

La Figura 9 y la SEQ ID NO:11 muestran la secuencia de ácido nucleico del vector rAAV-RdCVF1L.

Ensayo de título genómico de vectores de AAV recombinantes y purificados

Para medir el título genómico de los vectores rAAV-RdCVF1L y rAAV-GFP purificados, 5 µL del vector apropiado se mezclaron con 5 µL de tampón de DNasa 10X, 1 µL de enzima DNasa I (Roche, No. de Catálogo 04716728001), y agua para un volumen total de 50 µL. Después de la incubación durante 30 minutos a 37 °C, la enzima se inactivó mediante la incubación a 65 °C durante 10 minutos. Se añadió proteinasa K (0,5 µL) (Roche, No. de Catálogo 03115887001). La muestra se mezcló brevemente y se incubó durante 60 minutos a 50 °C. La proteinasa K se inactivó por medio de 95 °C durante 20 minutos. En paralelo, un control de aumento se usó donde 5 µL del estándar de aumento (2x10<sup>9</sup> ADN monocatenario de pAAV-GFP) se añadió a la reacción. Estas reacciones se realizaron en tiras de 8 tubos de 0,2 mL sin tapa (BioRad, No. de Catálogo TBS-0201), con el uso de tiras de 8 tapas planas (BioRad, No. de Catálogo TCS-0803) en un termociclador de PCR BioRad.

Una mezcla maestra para la qPCR se estableció, que contenía 825 µL de agua, 1,875 µL de iQ SYBR Green Supermix (BioRad, No. de Catálogo 170-8882) y 337,5 µL de cada uno de los cebadores (QPCR CMV 1 (SEQ ID NO:5) y QPCR

CMV 2 (SEQ ID NO:6)). Un volumen de 45  $\mu\text{L}$  de la mezcla se añadió por pocillo en una placa de PCR de 96 pocillos y ya sea 5  $\mu\text{L}$  del vector digerido, vector digerido de aumento, vector no digerido (5  $\mu\text{L}$  de vector purificado con 40  $\mu\text{L}$  de agua y 5  $\mu\text{L}$  de tampón de DNasa), vector aumentado no digerido (5  $\mu\text{L}$  de vector purificado con 35  $\mu\text{L}$  de agua, 5  $\mu\text{L}$  de tampón de DNasa y 5  $\mu\text{L}$  de estándar de aumento) se añadieron y se mezclaron. Un proceso de PCR se realizó y las muestras del Ciclo 3 se usaron para el análisis de la curva de fusión.

La concentración de esos genomas de ADN monocatenario se analizó mediante la PCR cuantitativa como se describió anteriormente. La concentración de las partículas del vector rAAV-RdCVF1L se determinó que era  $2 \times 10^{11}$  copias del genoma de vector por mililitro (GC/mL) y la concentración de partículas del vector rAAV-GFP se determinó que era  $2 \times 10^{11}$  GC/mL.

Tinción con plata del vector de AAV recombinante, purificado

Para examinar la pureza de los vectores de rAAV-RdCVF1L y rAAV-GFP purificados, los lisados de vectores se sujetaron al SDS-PAGE con un análisis de tinción con plata. Específicamente, 20  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis (8,4 mL de agua, 500  $\mu\text{L}$  de Tris 1 M (pH 8,0), 1 mL de Glicerol, 300  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M, 50  $\mu\text{L}$  de NP-40, 40  $\mu\text{L}$  de EDTA, 100  $\mu\text{L}$  de PMSF, 1 tableta de inhibidor de proteasa (Roche, No. de Catálogo 11836170001)) se añadió a las cámaras de tampón de AAV recombinante, purificado, respectivo y se mantuvieron sobre hielo durante 20 minutos. La reacción se centrifugó durante 2 minutos a 13 000 rpm y 4 °C en una centrifuga de sobremesa. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, 10  $\mu\text{L}$  del tampón de mezcla reductor 5x (Pierce, No. de Catálogo 39000) se añadieron y las muestras se incubaron durante 10 minutos a 95 °C.

La electroforesis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un gel de SDS-PAGE al 4-15 % se enjuagó con agua y se colocó en la cámara de gel. El tampón de corrida (Tris/Glicina/SDS 1X elaborado al diluir tampón de corrida de Tris/Glicina/SDS 10X (BioRad, No. de Catálogo 161-0732) con agua) se añadió a las cámaras de tampón superior e inferior. Los pocillos se enjuagaron dos veces con 200  $\mu\text{L}$  de tampón de corrida y las muestras se cargaron. Como control, un volumen de 1  $\mu\text{L}$  de escalera de proteína BENCHMARK™ (Invitrogen, No. de Catálogo 10747-012) se añadió a los pocillos exteriores. Se cargaron concentraciones iguales de los vectores, determinadas por medio del análisis de título genómico. El gel se condujo a 200 V hasta que el tinte alcanzó el fondo del gel. El gel se fijó y se tiñó con plata de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Biorad Silver Stain Plus, No. de Catálogo 161-0449).

Solo las tres proteínas de virus AAV, VP1 (90 kDa), VP2 (72 kDa) y VP3 (60 kDa) fueron visibles (Figura 1). Debido a que ninguna otra banda de proteína es visible en el análisis de tinción con plata, esto confirmaría que las preparaciones de vectores dieron por resultado la producción de partículas de vectores sumamente puras.

Expresión *In Vitro* de RdCVF1L mediada por la transducción de vectores de AAV de células ARPE-19

Para examinar la expresión y secreción de RdCVF1L mediada por el vector rAAV-RdCVF1L, las células epiteliales, pigmentarias, retinianas humanas ARPE-19 (ATCC, Manassas, VA) se sembraron en una cantidad de 200 000 células en 3 mL de cDMEM por pocillo en una placa de 6 pocillos. Para la expresión de transgenes después de la infección con AAV, el paso limitante del tiempo es la síntesis de la segunda cadena del genoma de ADN monocatenario, el cual puede tomar varias semanas, por ejemplo, véase Ferrari y otros (1996). *J Virol.* 70:3227-3234. Sin embargo, puede usarse radiación antes de la transducción para acelerar la expresión de proteínas después de la transducción del vector de rAAV en el cultivo de células, por ejemplo, véase Alexander y otros (1994) *J Virol.* 68:8282-8287.

Veinticuatro horas después de que las células se irradiaron con 175 Gy de  $^{137}\text{Cs}$  con un irradiador Modelo: Mark I-68 Self-shielded de Shepherd & Associates. Dos horas después, el medio se reemplazó por 1,5 mL de cDMEM nuevo y se añadieron 3  $\mu\text{L}$  de vector de AAV recombinante, purificado. Una placa no se transdujo (sin AAV) como control, una placa se transdujo con vector rAAV-GFP y una placa se transdujo con el vector rAAV-RdCVF1L.

Dos días después de la transducción, los sobrenadantes de las células transducidas y no transducidas se recolectaron y se filtraron a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Un volumen igual de tampón de lisado (9,4 mL de agua, 200  $\mu\text{L}$  de Tris 1 M (pH 8,0), 40  $\mu\text{L}$  de EDTA 0,5 M, 300  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M, 100  $\mu\text{L}$  de NP-40, 100  $\mu\text{L}$  de PMSF, 1 tableta de inhibidor de proteasa) se añadió y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Las células de cada placa se lavaron con PBS, se rasparon con el uso de un dispositivo levantador de células, se acumularon y se transfirieron en tubos cónicos de 15 mL. Las células se centrifugaron durante 4 minutos a 1200 rpm y 4 °C en una centrifuga Beckman Coulter Allegra 6KR y el sobrenadante se desechó. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 1 mL de tampón de lisis (véase anteriormente), se transfirieron en tubos de 1,5 mL y se incubaron sobre hielo durante 10 minutos. Los lisados celulares se centrifugaron durante 2 minutos a 13 000 rpm y 4 °C en una centrifuga de sobremesa. Los lisados celulares aclarados se separaron en alícuotas en volúmenes de 200  $\mu\text{L}$  en tubos de 1,5 mL y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Análisis de inmunotransferencia Western de sobrenadantes de células transducidas y lisados celulares para la expresión de RdCVF1L

El análisis de inmunotransferencia Western con el uso de un gel de SDS-PAGE al 4-20 % se usó para detectar la expresión del RdCVF1L con el uso de técnicas estándar. Como control, un volumen de 5 µL del Estándar de MAGICMARK XP™ (Invitrogen, No. de Catálogo LC5602) se añadió a los pocillos exteriores. El gel se condujo a 200 V hasta que el tinte alcanzó el fondo del gel. El análisis de inmunotransferencia Western se realizó con un equipo de análisis de inmunotransferencia Western Vectastain ABC-Amp de Vector Laboratories, de acuerdo con una versión modificada de las instrucciones del fabricante. El SDS-PAGE se equilibró en tampón de transferencia durante 20 minutos y las proteínas separadas por medio del SDS-PAGE se transfirieron en una membrana de nitrocelulosa con el uso de una Celda de Transferencia Semi-Seca de Inmunotransferencia a 20 V durante 40 minutos. Una vez que se completó la transferencia, la membrana se bloqueó en 200 mL de solución de caseína 1X con agitación suave en una plataforma mecedera durante al menos dos horas a temperatura ambiente (RT) para el sobrenadante y 4 °C durante toda la noche más 1 hora a temperatura ambiente para el lisado celular. La membrana se incubó con 50 mL de anticuerpo monoclonal específico antiproteína RdCVF de conejo (anticuerpo primario, generado por Covance (Denver, PA) con el uso de la proteína RdCVF1L con etiqueta His purificada que se produce en E. coli (Protein One, Rockville, MD)) diluida 1:2000 (sobrenadante) o 1:10 000 (lisado celular) en solución de caseína 1X con agitación suave a 4 °C durante toda la noche o 2 horas a temperatura ambiente, respectivamente. La membrana se lavó con 30 mL de una solución de caseína 1X 4 veces durante 5 minutos cada una a temperatura ambiente con agitación suave. La membrana se incubó con 30 mL de IgG anti-conejo de cabra biotinilada (anticuerpo secundario) diluida 1:24 000 en solución de caseína 1X durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. La membrana se lavó en 30 mL de solución de caseína 1X 3 veces durante 5 minutos cada una a temperatura ambiente con agitación suave. La membrana se incubó durante 45 minutos en Vectastain ABC-Amp en 50 mL de caseína 1X que contenía 100 µL de Reactivo A y 100 µL de Reactivo B. La membrana se lavó en 30 mL de solución de caseína 1X 3 veces durante 5 minutos cada una a temperatura ambiente con agitación suave.

La membrana se incubó en Tris, pH 9,5. La señal de quimioluminiscencia se adquirió con el uso de 6 mL de Substrato Duolox (Vector Laboratories, No. de Catálogo SK 6605) y exponiendo la membrana a una película de rayos X Kodak BioMax MS (Kodak Carestream Health, No. de Catálogo 8572786) en un casete de película durante 10 segundos a 5 minutos seguido por el desarrollo de la película con el uso de solución Kodak Developer (Kodak GBX, No. de Catálogo 1900984) y solución Kodak Fixer.

El nivel de proteína RdCVF1L expresada en el lisado celular (Figura 2A) indicó que el vector rAAV-RdCVF1L transdujo eficientemente las células ARPE. De manera más importante, la proteína RdCVF1L fue secretada eficientemente en el medio de cultivo de células de las células transducidas con el vector (Figura 2B). Sin embargo, dos bandas positivas en proteína RdCVF1L con el peso molecular esperado se observaron en las muestras de lisado celular transducidas con el vector rAAV-RdCVF1L (Figura 2A, carril 3) y tres de estas bandas se detectaron en las muestras de sobrenadante de células (Figura 2B, carril 3). Sin desear ser limitado por teoría alguna, las dos bandas de peso molecular más bajo en el sobrenadante de células (Figura 2B, carril 3) que tienen los mismos pesos moleculares que aquellos en el lisado celular pueden haber sido liberadas de las mismas células muertas en el cultivo. La tercera banda con un peso molecular ligeramente más alto en el sobrenadante representaron probablemente una forma secretada de RdCVF1L la cual estuvo ausente del lisado celular. Los datos también sugirieron que las tres formas de RdCVF1L, incluyendo la forma secretada de RdCVF1L, fueron modificadas probablemente después de la traducción.

## Resumen

El vector RdCVF1L-AAV fue capaz de transducir eficientemente las células epiteliales, pigmentarias, retinianas humanas (ARPE-19), lo que conduce a la expresión y secreción de la proteína RdCVF larga como se detectó por medio de la Inmunotransferencia Western. Dos bandas distintas de proteínas RdCVFL se observaron en las muestras de lisado celular transducidas con el vector rAAV-RdCVF1L además de una banda más alta. Tres bandas de proteínas RdCVFL se detectaron en el sobrenadante de células transducidas con el vector. Dos de éstas que tenían los mismos pesos moleculares que aquellas observadas en el lisado celular fueron posiblemente de células muertas en el cultivo de células. La tercera banda con un peso molecular ligeramente más alto representaron probablemente la forma secretada de RdCVF1L. Estos datos también sugirieron que el RdCVF1L, que incluye la forma secretada de RdCVF1L, se modificó probablemente después de la traducción.

## Ejemplo 3 - Expresión *in vivo* de RdCVF1 & GFP por el vector de AAV en ojos de ratón

El propósito de este estudio fue determinar si la administración sub-retiniana de rAAV-RdCVF1L puede incrementar los niveles de RdCVF en la retina de los ojos de ratón. El vector de serotipo 2 de AAV recombinante rAAV-RdCVF1L y el vector de control rAAV-GFP se prepararon como se describió en el Ejemplo 2.

Ratones hembra BALB/C, 5-6 semanas de edad, se adquirieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se utilizaron en este estudio. Se permitió a los animales un período de aclimatación mínimo de 1 semana antes del uso para el estudio. Se alojaron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas con una intensidad de luz de <50 lux en las jaulas. El alimento y el agua estuvieron disponibles libremente. El diseño experimental se resume en la Tabla 1:

Tabla 1: Diseño Experimental

Ratón (BALB/c)	Ojo	Inyección Sub-retinal	Evaluación
N=7	Ojo derecho (OD)	rAAV-RdCVF1L	Inmunohistoquímica por Inmunotransferencia Western
	Ojo izquierdo (OS)	Ninguna	
N=7	Ambos ojos (OU)	rAAV-GFP	

Las inyecciones sub-retinianas se realizaron bajo anestesia. Los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de 25-30 µg/gramo de ketamina combinada con 5-6 µg/gramo de xilazina. Las dosis de anestésico se ajustaron para lograr un plano profundo de anestesia. Los ojos se trataron con una aplicación tópica de 0,5 % de clorhidrato de proparacaína (Bausch & Lomb Inc. Rochester, NY) para la anestesia local y 0,3 % de AK-Tob (Bausch & Lomb Inc.) para la desinfección inmediatamente antes de los procedimientos. Las pupilas se dilataron con 1 % de tropicamida (Akorn, Inc., Buffalo Grove, IL).

En resumen, el ratón anestesiado se colocó bajo un microscopio funcional Zeiss con el ojo a ser inyectado bajo observación (magnificación de aproximadamente 10X). Se aplicó presión suave sobre los párpados con un fórceps de joyero para hacer que el globo ocular completo colapsara hacia adelante. La conjuntiva temporal superior se diseccionó cuidadosamente para exponer la esclerótica. Una aguja calibre 30 se usó para realizar una punción inclinada de la esclerótica, coroides y retina aproximadamente a las 11 en punto (ojo derecho) y 1 en punto (ojo izquierdo) 0,5 mm posterior al limbo. Una gota de Gonak (2,5 %, Akorn, Inc) se instiló sobre la córnea y un cubreobjetos se colocó suavemente sobre la superficie córnea para ayudar en la observación del fondo. Una aguja roma calibre 33 unida a una jeringa Hamilton de 5 µL se insertó a través de la esclerotomía en una dirección tangencial hacia el polo posterior sin tocar la lente y la punta de la aguja se colocó sobre la superficie interior de la retina. La retina se perforó y 1 µL del vector se inyectó en el espacio subretiniano. Después de la inyección, la aguja se retiró cuidadosamente y la conjuntiva se reposicionó. El éxito de cada inyección se confirmó al evaluar el fondo por signos de desprendimiento de retina. Cualquier ojo que exhibiera hemorragias subretinianas o intravítreas se excluyó, así como también los ojos que no exhibían un desprendimiento de retina (o ampolla). Neomicina y ungüento oftálmico de sulfato de polimixina B y Bacitracina de Zinc (Bausch & Lomb Inc.) se aplicó a la córnea para minimizar el secado de este tejido mientras que los animales se recuperaban de la anestesia sobre una manta de calentamiento.

Análisis de Inmunotransferencia Western

Las inmunotransferencias Western se generaron con extractos de proteína de ojos inyectados con el vector rAAV-RdCVF1L y ojos de control no inyectados, contralaterales que se obtuvieron seis semanas después de la administración del vector rAAV-RdCVF1L. En resumen, los globos oculares se enuclearon y los tejidos extraoculares y el segmento anterior se retiraron. Los segmentos posteriores restantes se congelaron rápidamente con nitrógeno líquido. Estas muestras se almacenaron a -80 °C hasta que se utilizaron para la extracción de proteínas. Para cada cápsula ocular, se añadieron 200 µL de reactivo de extracción de proteína de tejido T-PER helado (Pierce, No. de Catálogo 78510) con Coctel Inhibidor de Proteasa (Roche Diagnostics, No. de Catálogo 11836170001). Las muestras se sonicaron 5 segundos sobre hielo con un desmembrador Sónico (Fisher Scientific Modelo 100, Pittsburgh, PA). Las muestras sonicadas se mantuvieron sobre hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 10 000 g durante 5 minutos a 4 °C para retirar los restos de células. Los sobrenadantes se recolectaron y las concentraciones de proteínas se determinaron con el uso de un ensayo de proteínas Bradford. Para controles de RdCVFL, el lisado celular ARPE-19 transducido con rAAV-RdCVF1L sirvió como el control positivo y el lisado celular no transducido como el control negativo. Las proteínas se separaron por medio de la electroforesis de gel. Para cada carril, 36 µg de proteína total se cargaron en un Gel Prefabricado Criterion™ TGX™ al 4-20 % (Bio-Rad, No. de Catálogo 567-1094) y se sometieron a electroforesis a 200 voltios durante 70 minutos. Las proteínas se electrotransfirieron sobre membranas de inmunotransferencia de nitrocelulosa de 0,2 µm con el uso de un Dispositivo Trans Blot Semi-Dry. Las inmunotransferencias se bloquearon con el uso de una solución de caseína 1X (Vector Laboratories, No. de Catálogo SP-5020) durante 2 horas a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpo primario anti-RdCVFL de conejo (Covance Research Products, Denver, PA) diluido 1:2000 o anticuerpo policlonal rojo/verde anti-opsina de conejo, (Millipore, Temecura, CA) diluido 1:500. Después de tres lavados con solución de caseína 1X, cada inmunotransferencia se incubó con anticuerpo anti-IgG de conejo de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Vector Laboratories, No. de Catálogo AP-1000) diluido 1:3000. Las bandas de proteínas se visualizaron con el uso de un equipo de detección de substrato quimioluminiscente. La beta-tubulina (50-kD) se usó para el control de carga de proteína igual. La inmunotransferencia se decapó con tampón Restore Plus Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific, No. de Catálogo 46430) y se sondeó de nuevo con un anticuerpo monoclonal anti-β-tubulina (Sigma-Aldrich, No. de Catálogo T4026) diluido 1:500 seguido por anticuerpo anti-IgG de ratón de caballo conjugado con fosfatasa alcalina (Vector Laboratories, No. de Catálogo AP-2000) diluido 1:3000 en solución de caseína 1X.

La densitometría de proteínas de las autoradiografías, realizada con un dispositivo Kodak Imaging Station, se usó para cuantificar las bandas de proteína exploradas, las cuales se normalizaron con respecto al nivel de beta-tubulina en la misma inmunotransferencia.

La presencia de proteína RdCVF1L se detectó claramente en ojos que recibieron una inyección de rAAV-RdCVF1L como bandas dobles, inmunorreactivas, prominentes con un tamaño molecular de aproximadamente 30 kDa (Figura 3). La inmunotransferencia Western de lisados de células de células ARPE-19 transducidas por rAAV-RdCVF1L, los cuales sirvieron como control positivo, también produjo 2 bandas de proteína individuales con tamaños idénticos. Ni los extractos de proteína de ojos contralaterales los cuales no recibieron una inyección subretiniana, ni los ojos inyectados con rAAV-GFP, produjeron bandas de proteínas similares detectadas por el anticuerpo anti-RdCVFL (Figura 3). Las bandas dobles, inmunorreactivas fueron similares a las bandas dobles observadas *in vitro* en células ARPE-19 transducidas por rAAV-RdCVF1L. La razón de la ausencia de la tercera banda (probablemente la forma secretada de RdCVF1L) fue que esas muestras *in vivo* fueron extractos de proteína de células retinianas.

#### Análisis de Inmunohistoquímica

La inmunotinción de RdCVF1L se realizó en la preparación completa de la neurorretina y RPE-coroideas-esclerótica. Los animales se anestesiaron terminalmente y los ojos se enuclearon y se fijaron inmediatamente en paraformaldehído al 4 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 7.4 (1X), líquida (Gibco, No. de Catálogo 10010-031) durante toda la noche a 4 °C. Cada ojo de ratón se marcó en el cuadrante inferior de la córnea con tinta Hindú antes de la enucleación. Las cápsulas oculares se prepararon al retirar el segmento anterior bajo un microscopio de disección Leica. Una pequeña muesca se hizo en el cuadrante inferior para orientación. La neurorretina se diseccionó cuidadosamente del RPE, cortado en el nervio óptico. Las preparaciones completas se enjuagaron tres veces con PBS 1X y se bloquearon con suero de burro al 5 % en Tritón X-100 al 2 % en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de eliminar la solución de bloqueo, las preparaciones completas se incubaron secuencialmente con el anticuerpo primario-anti-RdCVF de conejo, 1:1000 en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche y el anticuerpo secundario-anti-conejo de burro ALEXA FLUOR 488® 1:1000 en Tritón X-100 al 2 % en PBS, 2 horas a temperatura ambiente. Después de los enjuagues finales con PBS, cada preparación completa se colocó en un soporte plano sobre un portaobjetos con los fotorreceptores orientados hacia arriba para la neurorretina y el RPE orientado hacia arriba para el RPE-coroidea-esclerótica. Los soportes planos entonces se examinaron con un microscopio Olympus BX51 equipado con una cámara digital (Spot RT Color 2.2.1, Diagnostic Instruments, Inc) y epifluorescencia.

La inmunohistoquímica confirmó la expresión incrementada de la proteína RdCVF1L en ojos inyectados con el vector rAAV-RdCVF1L. La inmunotinción robusta del RdCVF1L se observó en las células de RPE en los ojos inyectados con rAAV-RdCVF (Figura 4(A)), pero no de los ojos contralaterales no inyectados (Figura 4(B)). La expresión incrementada de RdCVF1L se observó solo en el área focal, que cubre aproximadamente un cuadrante de cada ojo, lo que indica que la expresión solo se confinó al área de la ampolla de la inyección subretiniana. Las muestras teñidas sin anticuerpo primario no mostraron ninguna inmunorreactividad (Figura 4(C)). Un incremento marcado en la expresión de esta proteína también se observó en células fotorreceptoras (Figura 5(A)) en los ojos inyectados con rAAV-RdCVF1L. La tinción fuerte de RdCVF1L se observó en los segmentos exteriores fotorreceptores en la neurorretina colocada en el soporte plano. Nuevamente, la tinción positiva se localizó solo en un área focal de la retina, que cubre de 10-30 % de la retina. Solo hubo una tinción de fondo en los ojos contralaterales no inyectados (Figura 5(B)). No se encontró inmunorreactividad en las muestras procesadas sin anticuerpo primario (Figura 5(C)).

#### Expresión de GFP en Ojos de Ratón

Para determinar si los vectores de AAV sometidos a prueba pudieron transducir eficientemente células de RPE y fotorreceptoras en ojos de ratón, un grupo de ratones (n=7) se inyectaron subretinariamente con rAAV-GFP y se sacrificaron 6 semanas después. El RPE-coroidea-esclerótica y la neurorretina se separaron y se colocaron en un soporte plano sobre portaobjetos. El microscopio fluorescente reveló la expresión robusta de GFP en el RPE y la capa de fotorreceptores (los datos no se muestran). Las células de RPE que expresaban GFP se esparcieron 1-2 cuadrantes del soporte plano, con el número máximo y las células que expresan el GFP más robustas presentes en el sitio de la inyección. Las células de RPE transducidas parecieron saludables ya que mantuvieron su morfología hexagonal. En las neurorretinas colocadas en soporte plano, la expresión de GFP se identificó en los segmentos exteriores fotorreceptores. Ocasionalmente las células retinianas interiores, tal como las células ganglionares, fueron positivas para GFP, posiblemente debido a la fuga del vector dentro del humor vítreo después de la inyección subretiniana.

#### Resumen

Este estudio demostró la transducción eficiente de células de RPE y fotorreceptoras por el vector rAAV-RdCVF1L después de una inyección subretiniana exitosa. La construcción de expresión de RdCVF1L suministrada por este vector condujo a incrementos significativos en los niveles de proteína RdCVF1L en los ojos de ratón.

Ejemplo 4 - Efecto de la expresión de RdCVF de forma larga mediada por el vector viral adeno-asociado sobre la supervivencia de fotorreceptores en ojos de ratón *rd10*

El propósito de este estudio fue determinar si la administración subretiniana de un vector de terapia génica basado en AAV que codifica el RdCVF1L podría promover la supervivencia de fotorreceptores en ratones *rd10*, un modelo animal de origen natural para la degeneración retiniana, heredada de humanos. Los ratones *rd10* son un modelo animal de origen natural para la retinitis pigmentaria recesiva, autosómica (RP). Los ratones *rd10* tienen una mutación puntual en

sentido erróneo en el gen de cGMP fosfodiesterasa de bastones, dando por resultado una apoptosis de células fotorreceptoras (Chang y otros (2007) *Vision Res* 47:624-633). Las células fotorreceptoras de bastones inician la degeneración a los 18 días de edad, en donde la muerte máxima de fotorreceptores ocurre en P25 (Gargini y otros (2007) *J Comp Neurol* 500:222-238). Por cinco semanas la mayoría de células fotorreceptoras han sido degeneradas (Chang y otros (2002) *Vision Res* 42:517-525; Chang y otros (2007) *Vision Res* 47:624-633; Gargini y otros (2007) *J Comp Neurol* 500:222-238). De un modo interesante, se ha descubierto que la crianza de ratones *rd10* en la oscuridad disminuye la velocidad de la degeneración de fotorreceptores por tanto como cuatro semanas (Chang y otros (2007) *Vision Res* 47:624-633), lo que sugiere que la exposición a la luz puede acelerar la muerte de fotorreceptores. Por otra parte, la degeneración retardada de fotorreceptores al mantener a estos ratones en la oscuridad puede extender la ventana de tiempo terapéutico para vectores que necesitan tiempo para la expresión de transgenes terapéuticos, por ejemplo, la expresión adecuada de transgenes de un AAV tomará usualmente aproximadamente 3 semanas.

Las parejas reproductoras de la cepa endogámica, congénica de ratones *rd10*, 4-5 semanas de edad, se adquirieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se cruzaron en una instalación para animales. Se alojaron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas con una intensidad de luz de <50 lux en las jaulas. El alimento y el agua estuvieron disponibles *ad libitum*. Después de la cirugía, como se describe posteriormente, las crías con sus madres se mantuvieron en la oscuridad hasta que se destetaron a la edad de 3 semanas. Después, todos los animales se transfirieron nuevamente a la habitación previa con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. El diseño experimental se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Diseño Experimental

Ratón (rd10)	Ojo	Inyección Sub-retinal	Evaluación
N=12	OD	rAAV-RdCVF1L	Histología retinal Morfología/número de conos
	OS	Ninguna	

Los animales (a la edad del día 3 posnatal) se anestesiaron mediante la hipotermia. Este método anestésico ha sido bien establecido para ratones neonatales y ratas para hasta 5 días de edad y es apropiado para procedimientos quirúrgicos, menores, cortos (5-15 minutos) en esos animales (Gaertner y otros *Anesthesia and Analgesia* 2ª ed. páginas 277-278). La cría se colocó sobre hielo triturado durante 3-4 minutos. Durante ese tiempo, el color de la cría se cambió de rosa a amarillento. Las inyecciones subretinianas se realizaron bajo este tipo de anestesia.

El ratón anestesiado se colocó bajo un microscopio funcional Zeiss con el ojo a ser inyectado bajo observación (magnificación de aproximadamente 10X). Los párpados y el área adyacente se desinfectaron con povidona-yoduro al 5 %. El ojo se expuso mediante la separación de la fisura de los párpados con el uso de una tijera Iris. Se aplicó presión suave sobre los párpados con un fórceps de joyero para hacer que el globo ocular completo se colapsará hacia adelante. Una gota de Tobromicina al 0,3 % (Bausch & Lomb Inc.) se proporcionó para la desinfección. Una aguja puntiaguda calibre 30 se usó para realizar una punción inclinada de la esclerótica, corioide y retina aproximadamente en la posición de 11 en Punto (ojo derecho) aproximadamente 0,5 mm posterior al limbo. Una aguja roma calibre 33 unida a una jeringa Hamilton de 5 µL se insertó a través de la esclerotomía en una dirección tangencial hacia el polo posterior. La punta de la aguja se colocó en el espacio subretiniano y 1 µL del vector de AAV se inyectó en el espacio subretiniano. Después de la inyección, la aguja se retiró lentamente. Cualquier ojo que exhibiera hemorragias subretinianas o intravítreas se excluyó del estudio. La neomicina y ungüento oftálmico de sulfato de polimixina B y bacitracina de zinc (Bausch & Lomb Inc.) se aplicó a la córnea para prevenir una infección y minimizar el secado de este tejido. Se permitió que los animales se recuperaran en una almohadilla de calentamiento.

Histología retiniana

Los ratones se anestesiaron profundamente y sus ojos se marcaron en el cuadrante superior con tinte rojo para tejido para la orientación. Después se sacrificaron y se enuclearon inmediatamente y se fijaron en fijador de Davidson durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. Después de la deshidratación secuencial en etanol y Clear-rite, los ojos se incorporaron en parafina (Fisher Sci., Houston, TX). Las secciones retinianas de 5 µm de espesor se cortaron a lo largo del meridiano vertical para permitir el examen de la retina superior e inferior. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron bajo un microscopio iluminado (Olympus BX51). El espesor de la capa nuclear exterior (ONL) se evaluó al contar el número de hileras de núcleos en la retina central y periférica. La morfología de los fotorreceptores también se examinó.

Los ojos de ratón *rd10* tratados se evaluaron por el grado de rescate estructural a la edad de 5 semanas. Una microscopía iluminada mostró una conservación obvia de la capa nuclear exterior (ONL) en los ojos tratados con AAV-RdCVF1L en comparación con los ojos contralaterales no tratados. Típicamente, la retina tratada con el vector RdCVF1L posee 2-5 hileras de núcleos fotorreceptores en las regiones superior y/o inferior a diferencia de 1-2 hileras en los ojos contralaterales, no tratados en las mismas ubicaciones (Figura 7). El rescate no se limitó a las áreas inyectadas, el cuadrante superior, ya que la protección también se observó en el cuadrante inferior. El análisis morfométrico mostró que aproximadamente 75 % de la retina se protegió en ojos tratados con el vector en comparación

con 34 % en ojos no tratados. Algunos fotorreceptores conservados poseían incluso segmentos interiores y exteriores (Figura 7E). Es notable que los fotorreceptores rescatados contenían células tanto de bastones como de conos.

#### Tinción y recuento de fotorreceptores de conos

5 La aglutinina de cacahuete (PNA, por sus siglas en inglés), un marcador específico de células de conos, se usó para teñir la preparación completa de la retina. Los ojos de ratón se marcaron en el cuadrante superior de la córnea con tinta Hindú y tinte rojo en el cuadrante temporal antes de la enucleación. Se fijaron inmediatamente en paraformaldehído al 4 % al menos durante toda la noche a 4 °C. Las cápsulas oculares se prepararon al retirar un segmento anterior bajo un  
10 microscopio de disección Leica. Una pequeña muesca se hizo en el cuadrante superior para la orientación. Después de 4 cortes radiales alrededor de la circunferencia, la neurorretina completa se diseccionó cuidadosamente de la cápsula ocular. Las retinas se enjuagaron tres veces con PBS 1X y se bloquearon con 6 % de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS (Gibco, No. de Catálogo 10010-031) con Tritón X-100 al 0.2 % durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de la remoción de la solución de bloqueo, las retinas se incubaron con Conjugados de Lectina PNA Alexa  
15 Fluor 594 (1:250 en PBS, Invitrogen Corp, Chicago, IL) durante toda la noche a 4 °C. Después de enjuagues finales con PBS, cada retina se colocó en un soporte plano sobre un portaobjetos de vidrio con los fotorreceptores orientados hacia arriba. Las preparaciones completas retinianas entonces se examinaron con un microscopio Olympus BX51 equipado con una cámara digital (Spot RT Color 2.2.1, Diagnostic Instrument, Inc) y epifluorescencia.

20 Para evaluar la densidad de células de conos en las preparaciones completas retinianas, se tomaron dos imágenes con un objetivo 60X de cada cuadrante retiniano en una ubicación de 1 y 2 mm del borde de la cabeza del nervio óptico, respectivamente. El número de conos presentados en cada imagen (390 x 293  $\mu$ m) se contó con el software Image Pro Plus (Media Cybernetics, Inc. Bethesda, MD).

25 Para algunos ojos, las secciones de criostato retiniano (12  $\mu$ m de espesor) se cortaron con un microtomo criostático Leica (Leica Microsystems, Modelo CM 1850, Leica, Bannockburn, IL) y se tiñeron con PNA, se examinaron con el microscopio fluorescente mencionado anteriormente.

30 Las células fotorreceptoras de conos se identificaron mediante el etiquetado con PNA, el cual tiñe selectivamente los segmentos interior y exterior de los conos, en neurorretina colocada en soporte plano. El microscopio fluorescente mostró una degeneración grave de células de conos en los ojos no tratados, particularmente en la retina central posterior, *por ejemplo*, alrededor de la cabeza del nervio óptico. Las células de conos perdieron segmentos exteriores y sus segmentos interiores son cortos, romos e irregulares. En contraste, los ojos tratados con el vector tuvieron una densidad más grande de conos, mucho menos segmentos de conos desorganizados y una tinción de conos más  
35 uniforme (los datos no se muestran). Bajo una magnificación más alta, las células de conos positivas para PNA se contaron en los 4 cuadrantes en ubicaciones de 1 y 2 mm de la cabeza del nervio óptico. La cuantificación de la densidad de conos mostró números significativamente altos de fotorreceptores de conos en los ojos tratados con el vector en relación con los ojos contralaterales no tratados: 181 $\pm$ 46,4 contra 50 $\pm$ 25,2 conos/0.114 mm<sup>2</sup>, p=0,001.

#### 40 Inmunohistoquímica de RdCVF

La inmunotinción de RdCVF se realizó en la preparación completa de la neurorretina y RPE-coroide-esclerótica. Las preparaciones completas se enjuagaron tres veces con PBS 1X y se bloquearon con suero de burro al 5 % y Tritón X-100 al 2 % en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la remoción de la solución de bloqueo, las  
45 preparaciones completas se incubaron secuencialmente con el anticuerpo primario-anti-RdCVF de conejo a 1:1000 en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche y el anticuerpo secundario-anti conejo de burro Alexa Fluor 488® a 1:1000 y Tritón X-100 al 2 % en PBS, 2 horas a temperatura ambiente. Después de enjuagues finales con PBS, cada preparación completa se colocó en un soporte plano sobre un portaobjetos de vidrio con los fotorreceptores orientados hacia arriba para la neurorretina y el RPE orientado hacia arriba para el RPE-coroide-esclerótica. Los soportes planos  
50 después se examinaron con un microscopio Olympus BX51 equipado con una cámara digital (Spot RT Color 2.2.1, Diagnostic Instruments, Inc) y epifluorescencia.

La inmunorreactividad robusta de RdCVF se observó en las células de RPE en 5 de 6 ojos inyectados con rAAV-RdCVF1L (un ejemplo representativo de un ojo se observa en (Figura 6A), pero no de los ojos contralaterales no inyectados (Figura 6B). Un ojo que recibió la inyección de rAAV-RdCVF1L se excluyó del análisis debido a la microoftalmia. La expresión eficiente de RdCVF1L se observó en el área focal, extendiéndose aproximadamente 1,5 a 3 cuadrantes de cada ojo. Las células de RPE que expresaban el RdCVF1L mantuvieron una morfología hexagonal típica (Figura 6E), lo que sugiere que no hubo un impacto negativo obvio sobre el RPE a partir de la administración del vector o la expresión del RdCVF1L. Similarmente a la expresión en el RPE del RdCVF1L, la expresión eficiente en la  
60 inmunorreactividad de esta proteína también se observó en la neurorretina en los ojos inyectados con rAAV-RdCVF1L (Figura 6C). No hubo tinción en los ojos contralaterales no inyectados (Figura 6D). La tinción fuerte de RdCVF1L se observó claramente en las células fotorreceptoras en 3 de 5 ojos, particularmente en los segmentos interior/exterior (Figura 6F). La falta de inmunorreactividad de RdCVF en los otros 2 ojos se puede atribuir a la degeneración de fotorreceptores. Nuevamente, la tinción positiva se localizó solo en un área focal de la retina. La observación de que  
65 ninguna expresión detectable del RdCVF1L en los ojos contralaterales no inyectados sugiere que el nivel de RdCVF1L endógeno puede ser más bajo que el límite de detección por medio de la tinción inmunohistoquímica.

Resumen

Este estudio demostró que la inyección subretiniana de vectores de rAAV-RdCVF1L condujo a una transducción eficiente de las células de RPE y fotorreceptoras y una expresión robusta de proteína RdCVF1L en los ojos de ratones *rd10*. De manera más importante, este vector prolongó la supervivencia de fotorreceptores tanto de bastones como de conos y mejoró la morfología de los conos en este modelo animal clínicamente relevante de retinitis pigmentaria (RP).

Ejemplo 5 - Inyección subretiniana de células fotorreceptoras conservadas con rAAV-RdCVF1L distantes del sitio de inyección en ratones *rd10*

Para examinar si el rescate de células fotorreceptoras por el rAAV-RdCVF1L puede extenderse a las áreas distantes del sitio de la inyección, el rAAV-RdCVF1L (1  $\mu$ L,  $2 \times 10^8$  GC) se inyectó subretinariamente en el cuadrante superior de los ojos derechos de ratones *rd10* en el día posnatal 3, con los ojos contralaterales no inyectados como controles. Los ratones se sacrificaron a las 5 semanas de edad. La histología retiniana de la cápsula ocular completa se examinó. La Figura 8 muestra una fotomicrografía iluminada de una cápsula ocular de un ratón *rd10* de 5 semanas de edad representativo que recibió una inyección subretiniana de rAAV-RdCVF1L en un ojo (Panel A, Figura 8) y sin tratamiento en el ojo contralateral (Panel B, Figura 8). Se debe observar la diferencia en el espesor de ONL entre el ojo tratado y el ojo no tratado. La conservación de fotorreceptores se observó claramente en la retina completa del ojo tratado con rAAV-RdCVF1L (Panel A, Figura 8). El sitio de la inyección en la retina superior se etiquetó. En contraste, la mayoría de células fotorreceptoras se perdieron excepto en la retina periférica inferior en el ojo contralateral no tratado (Panel B, Figura 8).

Ejemplo 6 - La inyección subretiniana de rAAV-RdCVF1L conservó las células fotorreceptoras de bastones

Para examinar si las células fotorreceptoras de bastones pueden ser rescatadas (además de las células fotorreceptoras de conos) por el rAAV-RdCVF1L, los ojos derechos de ratones *rd10* en el día posnatal 3 se inyectaron subretinariamente con rAAV-RdCVF1L (1  $\mu$ L,  $2 \times 10^8$  GC), con los ojos contralaterales no inyectados como controles. Los ratones se sacrificaron a las 5 semanas de edad. El tejido retiniano se sujetó a la tinción inmunohistoquímica con rodopsina. Las secciones se contratiñeron con DAPI (diamidino-2-fenilindol, color azul) para ayudar en la identificación de capas retinianas.

La expresión robusta de rodopsina se observó en tanto la capa de segmento como la capa nuclear de células fotorreceptoras en los ojos tratados con rAAV-RdCVF1L (los datos no se muestran). Sin embargo, solo algunas células mostraron tinción con rodopsina en el ojo no tratado (los datos no se muestran).

Ejemplo 7 - Rescate funcional de fotorreceptores por RdCVFL mediado por vectores virales adeno-asociados en ratones *Rd10*

El propósito de este estudio fue evaluar el efecto protector de RdCVF suministrado por un vector de AAV sobre la función y la estructura de la retina en los ratones *rd10*. Los ratones *rd10* neonatales, de 3 o 4 días de edad, se inyectaron subretinariamente con el vector rAAV-RdCVFL en un ojo mientras que el ojo contralateral se dejó sin tratamiento. Cinco semanas después de la inyección subretiniana, los ratones se sometieron a prueba con un electroretinograma (ERG) para evaluar las funciones retinianas. Después de los ERG, los ratones se sacrificaron y sus ojos se procesaron para la evaluación histológica de la retina.

El vector de serotipo 2 de AAV recombinante rAAV-RdCVF1L y el vector de control rAAV-GFP se prepararon como se describió en el Ejemplo 2.

Las parejas de reproducción de la cepa endogámica congénica de ratones *rd10*, 4-5 semanas de edad, se adquirieron de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) y se cruzaron en la instalación para animales. Se alojaron bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas con una intensidad de luz de <50 lux en las jaulas. El alimento y el agua estuvieron disponibles ad libitum. Después de la cirugía, las crías con sus madres se mantuvieron en la oscuridad hasta que se destetaron a la edad de 3 semanas. Después, todos los animales se transfirieron nuevamente a la habitación previa con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. El diseño experimental se resume en la Tabla 3.

Tabla 3

Ratón ( <i>rd10</i> )	Ojo	Inyección Sub-retinal	Evaluación
N=13	OD	rAAV-RdCVF1L	ERG
	OS	Ninguna	Histología retinal

Los animales se anestesiaron y la inyección subretiniana se realizó como se describió anteriormente en el Ejemplo 4.

Los ratones se adaptaron a la oscuridad durante toda la noche (al menos 14 horas) antes de los experimentos y sus pupilas se dilataron con colirio de tropicamida al 0,5 % (Alkorn). La anestesia se indujo mediante una inyección intraperitoneal de ketamina y xilazina. Los electrodos de agujas de plata sirvieron como referencia (frente) y tierra (cola) y electrodos de anillo de DTL como electrodos activos. Se aplicó gonesol para asegurar un buen contacto eléctrico y

para mantener los ojos hidratados durante el procedimiento completo. La configuración de registro presentó un tazón de Ganzfeld, un amplificador de DC y una unidad de control y registro basada en computadora del sistema de electroretinografía Espion E3 (Diagnosys LLC, Lowell, MA). Los ERG se registraron de ambos ojos simultáneamente después de que los ratones se colocaron en el tazón de Ganzfeld. Los registros de destello individual y centelleo se obtuvieron ambas bajo condiciones adaptadas a la oscuridad (escotópicas) y adaptadas a la luz (fotópicas). Los estímulos de destello individual se presentaron con intensidades crecientes, alcanzando de  $10^{-2}$  a  $25 \text{ cds/m}^2$ . Cinco respuestas se promediaron con un intervalo entre estímulos de 5 o 17 segundos. Los estímulos de centelleo tuvieron una intensidad de  $3 \text{ cds/m}^2$  con frecuencias de 2, 5, 10, 15 y 30 Hz. La adaptación a la luz se realizó con una iluminación de fondo de  $30 \text{ cds/m}^2$  presentada durante 10 minutos para alcanzar un nivel estable de las respuestas fotópicas. Para comparación de las amplitudes promedio, se usó una prueba de par t de Student.

Los ratones se anestesiaron profundamente y se marcaron sus ojos en el cuadrante superior con tinte rojo para tejido para la orientación. Después se sacrificaron y se enuclearon inmediatamente y se fijaron en fijador de Davidson durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. Después de la deshidratación secuencial en etanol y Clear-rite, los ojos se incorporaron en parafina (Fisher Sci., Houston, TX). Las secciones retinianas de  $5 \mu\text{m}$  de espesor se cortaron a lo largo del meridiano vertical para permitir el examen de la retina superior e inferior. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina y se examinaron bajo un microscopio iluminado (Olympus BX51). El espesor de la capa nuclear exterior (ONL) se evaluó al contar el número de hileras de núcleos en la retina central y periférica. La morfología de los fotorreceptores también se examinó.

## Resultados

### Rescate de la función retiniana en ojos tratados con rAAV-RdCVF1L

Como se esperaba, a la edad de 5 semanas, los ratones rd10 mostraron una reducción significativa de respuestas escotópicas y fotópicas en el registro de ERG en comparación con los ratones C57BL/6 de tipo silvestre de edad coincidente (los datos no se muestran). Sin embargo, en los ratones rd 10 ( $n=8$ ) los ojos tratados con rAAV-RdCVF1L mostraron un incremento de aproximadamente 3 veces en las amplitudes de ondas-b ( $33,6 \pm 14 \mu\text{V}$ ) en comparación con los ojos semejantes no tratados ( $11,5 \pm 8,4 \mu\text{V}$ ) bajo la intensidad de destello de 25 cd en el fondo escotópico (Figuras 10A y 10B). Bajo esta condición, las respuestas tanto de los bastones como de los conos se registraron. Los análisis estadísticos indican diferencias significativas en las amplitudes de ERG entre ojos tratados con rAAV-RdCVF1L y los ojos de control ( $p=0,025$ ). Algunos animales ( $n=5$ ) se excluyeron de la prueba de ERG (se excluyeron antes de la prueba de ERG) debido a la opacidad corneal, cataratas o microftalmia que resulta probablemente de una cirugía intraocular en el período neonatal.

### Conservación estructural de fotorreceptores en ojos tratados con rAAV-RdCVF1L:

Para determinar si las respuestas de ERG incrementadas en ojos tratados con rAAV-RdCVF1L se correlacionan con la conservación estructural de células fotorreceptoras en los ratones rd10, los animales se sacrificaron inmediatamente después del ERG. Sus ojos se procesaron para la evaluación histológica. Un microscopio iluminado mostró una conservación obvia de la capa nuclear exterior (ONL) en los ojos tratados con AAV-RdCVFL en comparación con los ojos contralaterales no tratados. Típicamente, la retina tratada con el vector poseía 2-4 hileras de núcleos fotorreceptores en las regiones superior y/o inferior a diferencia de 1-2 hileras en los ojos contralaterales no tratados (Figuras 11A y 11B). La conservación de fotorreceptores no se limitó al área inyectada - el cuadrante superior ya que la protección también se observó en el cuadrante inferior. Algunos fotorreceptores conservados poseían incluso segmentos interiores y exteriores. Los análisis morfométricos muestran un incremento significativo en el número de hileras de ONL en ojos tratados ( $2,5 \pm 1,0$ ) en comparación con aquel en los ojos de control ( $1,2 \pm 0,2$ ) ( $p=0,006$ ) (Figura 12).

## Resumen

El ERG demostró un incremento significativo en las amplitudes de onda-b en ojos tratados con rAAV-RdCVF1L ( $33,6 \pm 14 \mu\text{V}$ ) en relación con los ojos semejantes no tratados ( $11,5 \pm 8,4 \mu\text{V}$ ). El incremento en las amplitudes de ERG se correlacionó con un mejoramiento de la estructura retiniana. Este estudio demostró que una inyección subretiniana de los vectores de rAAV-RdCVF1L mejoraron significativamente la función retiniana y retardaron la degeneración de fotorreceptores en los ratones Rd10.

## Secuencias

SEQ ID NO:1 – Secuencia del péptido señal de Igk y secuencia codificante de RdCVF1L recodificada (-ATG)

ES 2 774 779 T3

5 ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGA  
CGCGGCCCAGCCGGCCAGGCGCGCCGTACGAAGCTTGGTACCCGCCAGCCTGTTTCAGCGGCC  
GGATCCTGATCAGGAACAACAGCGACCAGGACGAGCTGGACACCGAGGCCGAAGTGAGCAGG  
AGGCTGGAGAACAGACTGGTGTCTGTTCTTTGGCGCCGGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGC  
CTTCGTGCCCATCCTGAAGGATTTCTTTGTGAGGCTGACCGACGAGTTCTACGTGCTGAGAG  
10 CCGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGTGAGCCAGGACAGCACCGAGGAGCAGCAGGACCTGTTT  
CTGAAGGACATGCCCAAGAAGTGGCTGTTCCCTGCCCTTCGAGGACGACCTGAGAAGAGACCT  
GGGCAGGCAGTTCAGCGTGGAGAGACTGCCCCCGTGGTGGTGTGAAGCCTGATGGCGACG  
TGCTGACCAGAGATGGCGCCGACGAGATCCAGAGACTGGGCACCGCCTGCTTCGCCAACTGG  
CAGGAGGCCGCCGAGGTCTGGACAGAACTTCCAGCTGCCCGAGGATCTGGAGGATCAGGA  
GCCCAGATCCCTGACCGAGTGCCTGAGGCGGCACAAGTACAGAGTGGAGAAGGCCGCCAGAG  
15 GCGGCAGAGACCCTGGCGGCGGAGGAGGAGAGGAGGGCGGAGCCGGCGGACTGTTCTGA

SEQ ID NO:2 - RdCVF1L recodificada con Secuencia de péptido señal de IgK (-Met)

20 METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRAVRSLVPASLFSGRILIRNNSDQDELDTAEVSR  
RLENRLVLLFFGAGACPQCQAFVPI LKDFVRLTDEFYVLRRAQLALVYVSQDSTEEQQDLF  
LKDMPKKWFLFPFEDDLRRDLGRQFSVERLPAVVVLKPDGDVLRDGADEIQRLGTACFANW  
QEAAEVLDRNFQLPEDLEDQEPRSLTECLRRHKYRVEKAARGGRDPGGGGGEEGGAGGLF  
25

SEQ ID NO:3 - Secuencia de péptido señal de IgK y secuencia codificante de RdCVF1L recodificada (+ATG)

30 ATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGA  
CGCGGCCCAGCCGGCCAGGCGCGCCGTACGAAGCTTGGTACCCATGGCCAGCCTGTTTCAGCG  
GCCGGATCCTGATCAGGAACAACAGCGACCAGGACGAGCTGGACACCGAGGCCGAAGTGAGC  
AGGAGGCTGGAGAACAGACTGGTGTCTGTTCTTTGGCGCCGGAGCCTGCCCTCAGTGCCA  
35 GGCCTTCGTGCCCATCCTGAAGGATTTCTTTGTGAGGCTGACCGACGAGTTCTACGTGCTGA  
GAGCCGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGTGAGCCAGGACAGCACCGAGGAGCAGCAGGACCTG  
TTCCTGAAGGACATGCCCAAGAAGTGGCTGTTCCCTGCCCTTCGAGGACGACCTGAGAAGAGA  
CCTGGGCAGGCAGTTCAGCGTGGAGAGACTGCCCCCGTGGTGGTGTGAAGCCTGATGGCG  
ACGTGCTGACCAGAGATGGCGCCGACGAGATCCAGAGACTGGGCACCGCCTGCTTCGCCAAC  
40 TGGCAGGAGGCCGCCGAGGTCTGGACAGAACTTCCAGCTGCCCGAGGATCTGGAGGATCA  
GGAGCCCAGATCCCTGACCGAGTGCCTGAGGCGGCACAAGTACAGAGTGGAGAAGGCCGCCA  
GAGGCGGCAGAGACCCTGGCGGCGGAGGAGGAGAGGGCGGAGCCGGCGGACTGTTCTGA

SEQ ID NO:4 – RdCVF1L recodificada con secuencia de péptido señal de IgK (+Met)

45 METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRAVRSLVPMASLFSGRILIRNNSDQDELDTAEVSR  
RRLENRLVLLFFGAGACPQCQAFVPI LKDFVRLTDEFYVLRRAQLALVYVSQDSTEEQQDL  
FLKDMPKKWFLFPFEDDLRRDLGRQFSVERLPAVVVLKPDGDVLRDGADEIQRLGTACFAN  
WQEAAEVLDRNFQLPEDLEDQEPRSLTECLRRHKYRVEKAARGGRDPGGGGGEEGGAGGLF  
50

SEQ ID NO:5 - Cebador de CMV para CPCR  
GGCGGAGTTGTTACGACAT

55 SEQ ID NO:6 - Cebador de CMV para CPCR  
GGGACTTTCCTACTTGGCA

SEQ ID NO:7 - región codificante de RdCVF1L nativa

60

65

ES 2 774 779 T3

ATGGCCTCCCTGTTCTCTGGCCGCATCCTGATCCGCAACAATAGCGA  
CCAGGACGAGCTGGATACGGAGGCTGAGGTGAGTCGCAGGCTGGAGA  
ACCGGCTGGTGTCTGCTGTTCTTTGGTGTCTGGGGCTTGTCCACAGTGC  
5 CAGGCCTTCGTGCCCATCCTCAAGGACTTCTTCGTGCGGCTCACAGA  
TGAGTTCTATGTACTGCGGGCGGCTCAGCTGGCCCTGGTGTACGTGT  
CCCAGGACTCCACGGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCCCTCAAGGACATG  
10 CCAAAGAAATGGCTTTTCCTGCCCTTTGAGGATGATCTGAGGAGGGA  
CCTCGGGCGCCAGTTCTCAGTGGAGCGCCTGCCGGCGGTCTGTGTGC  
TCAAGCCGGACGGGGACGTGCTCACTCGCGACGGCGCCGACGAGATC  
CAGCGCCTGGGCACCGCCTGCTTCGCCAACTGGCAGGAGGCGGCCGA  
15 GGTGCTGGACCGCAACTTCCAGCTGCCAGAGGACCTGGAGGACCAGG  
AGCCACGGAGCCTCACCGAGTGCCTGCGCCGCCACAAGTACCGCGTG  
GAAAAGGCGGCGCGAGGCGGGCGGACCCCGGGGAGGGGGTGGGGA  
GGAGGGCGGGGCCGGGGGGCTGTTCTGA

20 SEQ ID NO:8 - pAAV-SRd269

25 CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCG  
GCGACCTTTGGTGCCTCGCCGGCCTCAGTGAAGCGAGCGAGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTC  
CATCACTAGGGTTCTCGCGCCGCACGCGTGGAGCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG  
GGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG  
30 CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT  
AACGTCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACT  
TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAA  
TGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACAT  
35 CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTG  
GATAGCGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCACTGACGTCAATGGGAGTTTG  
TTTTGCACCAAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAA  
ATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCA  
40 GATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCA  
GCCTCCGCGGATTCGAATCCCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCTCCGTGCCAA  
GAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACAAAAAATGCTTTCTTCTTTAAT  
ATACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTACGGGCAATAAT  
45 GATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTA  
AGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAACCTGATGTAAGAG  
GTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTTATTTTATGGTTGGG  
ATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTA  
50 TCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAA  
GAATTGGGATTCGAACATCGATTGAATTCGAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT  
GGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGCGGCCAGCCGCCAGGCGCGCC  
GTACGAAGCTTGGTACCGCCAGCCTGTTTACGCGCCGGATCCTGATCAGGAACAACAGCGA  
55 CCAGGACGAGCTGGACACCGAGGCCGAAGTGAAGCAGGAGGCTGGAGAACAGACTGGTGTGCT  
TGTTCTTTGGCGCCGGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTTCGTGCCATCCTGAAGGATTTT  
TTTGTGCGGCTGACCGACGAGTTCTACGTGCTGAGAGCCGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGT  
GAGCCAGGACAGCACCGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCCCTGAAGGACATGCCAAGAAGTGGC  
60 TGTTCTTCCCTTCGAGGACGACCTGCGGAGATGACGAGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGA

CCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGGCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCC  
 TAATAAAATTAAGTTGCATCATTTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGG  
 5 AGGGGGGTGGTATGGAGCAAGGGGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTA  
 TTGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGG  
 TTCAAGCGATTCTCCTGCCTCAGCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGG  
 CTCAGCTAATTTTTGTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTACCATAATTGGCCAGGCTGGTCTC  
 10 CAACTCCTAATCTCAGGTGATCTACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGT  
 GAACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTTCTGATTTTGTAGGTAACCACGTGCGGACCGAGCGGC  
 CGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAG  
 15 GCCGGGCGACCAAGGTCGCCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCG  
 AGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGTATTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTA  
 TTTACACCCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGG  
 CGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCT  
 20 TTCGCTTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGTTGCGCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCG  
 GGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATT  
 TGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTG  
 GAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTC  
 25 GGGCTATCTTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGC  
 TGATTTAACAATAATTTAACGCGAATTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGC  
 ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACC  
 30 CGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCG  
 TCTCCGGGAGCTGCATGTGTGAGAGGTTTTACCCTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAG  
 GGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTC  
 AGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATT  
 35 CAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGG  
 AAGAGTATGAGTATCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTTCGGGCATTTTGCCT  
 TCCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTG  
 40 CACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCC  
 GAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCG  
 TATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACTACTTCTCAGAATGACTTGGTTG  
 45 AGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGT  
 GCTGCCATAACCATGAGTGATAAACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACC  
 GAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGG  
 AACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATG  
 50 GCAACAACGTTGCGCAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATT  
 AATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTG  
 GCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCA  
 55 CTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAAC  
 TATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTTGGTAAC  
 TGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAA  
 60 AGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTC  
 GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTC  
 TGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTCCG  
 65 GATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAA

ES 2 774 779 T3

TACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGA ACTCTGTAGCACCGCCTA  
CATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTT  
5 ACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGG  
TTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTG  
AGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGC  
10 AGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAG  
TCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGC  
GGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCT  
TTTGCTCACATGT

15 SEQ ID NO:9 - pAVTLrRd055

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCAT  
20 TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATA  
GGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGT  
CAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAA  
25 GTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTT  
AGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGC  
GGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGC  
30 TTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGG  
CGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG  
ATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACGACGGCCAGTGAGC  
GCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGA  
35 ACTAGTGGATCCCCGGGATCCCGTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTC  
ATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCG  
CCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGG  
GACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATC  
40 AAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGG  
CATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT  
CATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTG  
45 ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAA  
AATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAG  
GCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAACCATATCTTCACTCTGTACTTCAGCTCGTGTAGCT  
CATTAGCTCCGAGCTCCCCAACCTACAGCCTGAGAGGCACTGGCTCGGTTGGGTAGCCAGCC  
50 TTTCCGGTAATAAAGGCTTGTTGGCATTCCGCATCTACCCGTGCCTCCTGTCTTGTCTTACT  
CGAGCGAACCCACA ACTCCGTCTGCTGAGCTCACAGCTCGCGGGGCGGTGAAGAACACCCA  
ACAGTTGGCGCCCAACGTGGGGCTGAGTAAGAGAGACTCGGCTCGAGTAAAAGAAGACCCAG  
CTCGAACGAGAAGACTCCGGACAGGTGAGTAGTTGCGTGTTTTTCCCGGGGTGAAGAGAAGG  
55 GAGTTAGAAAAGAAGCTTCGTAAGGTTAGGGTGACACCCCAACAGGATAAATATTATACTAT  
AGGGAATCTTCAATGGGCCATTAGAATCACGTGATGCATCGATAAATAAAAAAGAGGGGGA  
ATAGGGGGCCATACACCATATGAAATATACCTAGAATCAGAACATACCAAATACCAAGACCA  
60 ACTAGAACAACAATTTTTCAAACAAAAAATTGAAAAGTGGTGTACGTAAGGAACAGAAGAA  
AGGAATGGAAAGGACCCTACAAAGTGTGTGGGACGGAGACGGGGCAGCAGTAATAGAGGAG  
AATTCGTGGATTCTTGTAAGGTCCCCAGCTATGGGTTTGTGGTAGTAAATGACACAGATAC  
ACCACCATCCCTCCGCATCCGAAAGCCTCGAGCAGTCGGACTAGCAATATTCCTGCTTGTGC  
65 TGGCTATCATGGCCATCACATCCTCCTTGGTGGCAGCTACAACGCTCGTGAACCAGCACACG

ACGGCTAAGGTTGTGGAGAGGGTTGTGCAAAATGTGTCATATATTGCTCAAACCCAGGACCA  
 ATTCACCCACCTGTTTCAGGAATATAAACAACAGATTAATGTCTACACCATAGAGTTTCAT  
 5 ACTTGGAGTGTACACTTAATGGGAATGAAAGACCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGGATC  
 AAGGTTAGGAACAGAGAGACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTC  
 CTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTG  
 10 TGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCCGC  
 CCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAATGACC  
 CTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTTCGCGCGCTTCTGCTC  
 CCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCC  
 15 ACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGACTCTAGAGGATCCACCGGTGCGCACTTAAGG  
 CCTGCAGCTAGCGCCACCATGGCCAGCCTGTTTCAGCGGCCGGATCCTGATTCGCAACAACAG  
 CGACCAGGACGAGCTGGACACCGAGGCCGAGGTGTCCAGGAGACTGGAGAACAGGCTGGTGC  
 20 TGCTGTTCTTTGGCGCCGGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTTCGTGCCCATCCTGAAGGAT  
 TTCTTTGTGAGGCTGACCGACGAGTTCTACGTGCTGAGAGCCGCCAGCTGGCCCTGGTGTA  
 TGTGAGCCAGGACAGCACCGAGGAGCAGCAGGACCTGTTTCTGAAGGACATGCCCAAGAAGT  
 GGCTGTTTCTGCCCTTCGAGGACGACCTGAGAAGAGACCTGGGCAGGCAGTTCAGCGTGGAG  
 25 AGACTGCCCGCCGTGGTGGTGTGAAGCCTGATGGCGACGTGCTGACCAGAGATGGCGCCGA  
 CGAGATCCAGAGACTGGGCACCGCCTGCTTCGCCAACTGGCAGGAGGCCGCCGAGGTCTTGG  
 ACAGAAACTTCCAGCTGCCCCGAGGATCTGGAGGATCAGGAGCCCAGATCCCTGACCGAGTGC  
 30 CTGAGGCGGCACAAGTACAGAGTGGAGAAGGCCGCCAGAGGCCGAGAGACCCTGGCGGCCG  
 AGGAGGAGAGGAGGGCGGAGCCGGCGGACTGTTCTGATGAGCTAGCACCGGTTGTACAAGTC  
 AAGCGGCCAACCCTCCCTAGATCTGTTAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATT  
 35 GACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTT  
 TGTATCATGCTATTGCTTCCCCTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTG  
 CTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTT  
 40 TGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTT  
 TCGCTTTCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGG  
 ACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCCCTT  
 TCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCCTTCTGCTACGTCC  
 45 CTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCCTCCC CGCGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTT  
 CCGCGTCTTCGCCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCCTGT  
 TTCGCCTTCTAGGAACTCCTTTGGGACATCTTCCGCCACGCTCCTATTTTAAACTTAAAAG  
 50 GGTGGACTGTGGGGCAGGGTGGGACCTCAGGACAACAGCAGCCCCGGACTTCCCATATGTG  
 TTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAATCTGTACTTCAGCTCGTGTAGC  
 TCATTAGCTCCGAGCTCCCCAACCTACAGCCTGAGAGGCACTGGCTCGGTTGGGTAGCCAGC  
 CTTTCGGGTAATAAAGGCTTGTTGGCATTCCGGCATCTACCCGTGCCTCCTGTCTTGTCTTAC  
 55 TCGAGCGAACCCACAACCTCCGTCCCTGCTGAGCTCACAGCTCGCGGGGCGGTGAAGAACACCC  
 AACAGATATATACTGTCAACATCCCATTTGGTAGCTTATGTTCTAGACAAGATTCTCAACAA  
 ATTCTTCCCCTGAATGTTTATTTAAAAAACAACACTACTAGGGCTCTGTGCATATGT  
 60 AAGTGAGATCCTTATTAGCAGGAGAACAGCAATAAGATATTATTACATTACAATATTATATC  
 CTAGGGTATTATAATGCAAGGCCATTATCACATACTTGGCTAACAGGGTCCATACTGTTGTA  
 ATGTATTTAAACCAGACTGAGTAATAAAATTGACAACAATATAATCATCATCTTTGTTATAG  
 65 GTGGGGGCATTTTTCAGATGAGGTCTCAGAGCACCTGCCAAGCATGGACCTCGAGGGGGGGC  
 CCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTC

ATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGGA  
 GCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGC  
 5 TCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACG  
 CGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGC  
 GCTCGGTTCGTTCCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCC  
 ACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAA  
 10 CCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACA  
 AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTT  
 CCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTC  
 15 CGCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT  
 CGGTGTAGGTTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCCCGACCGC  
 TGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACT  
 GGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCT  
 20 TGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAAGCAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG  
 AAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGG  
 TAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAG  
 25 ATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATT  
 TTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAATGAAGTTT  
 TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTG  
 AGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTG  
 30 TAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGA  
 CCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCA  
 GAAGTGGTCTTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGA  
 35 GTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGT  
 GTCACGCTCGTCGTTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTA  
 CATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGA  
 40 AGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGT  
 CATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAAT  
 AGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACAT  
 AGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGAT  
 45 CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCAT  
 CTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAATGCCGCAAAAAG  
 GGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCCTTTTTCAATATTATTGAAG  
 50 CATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAC  
 AAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

SEQ ID NO:10 - pAAV-LRd268

55 CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCCG  
 GCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTC  
 CATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGACGCGTGGAGCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG  
 60 GGTCAATAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG  
 CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT  
 AACGTCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACT  
 65 TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAA  
 TGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT

CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTG  
 GATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTTG  
 5 TTTTGCACCAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAA  
 ATGGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCA  
 GATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCA  
 GCCTCCGCGGATTTCGAATCCCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTTCCCGTGCCAA  
 10 GAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACAAAAATGCTTTCTTCTTTAAT  
 ATACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTACGGGCAATAAT  
 GATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTA  
 15 AGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAAGTATGTAAGAG  
 GTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGG  
 ATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTA  
 TCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCATCACTTTGGCAA  
 20 GAATTGGGATTTCGAACATCGATTGAATTCGAGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT  
 GGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGCGGCCAGCCGGCCAGGCGCGCC  
 GTACGAAGCTTGGTACCCGCCAGCCTGTTTCAGCGGCCGGATCCTGATCAGGAACAACAGCGA  
 25 CCAGGACGAGCTGGACACCGAGGCCGAAGTGAGCAGGAGGCTGGAGAACAGACTGGTGCTGC  
 TGTTCTTTGGCGCCGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTTCGTGCCCATCCTGAAGGATTTT  
 TTTGTGAGGCTGACCGACGAGTTCTACGTGCTGAGAGCCGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGT  
 30 GAGCCAGGACAGCACCGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCTGAAGGACATGCCCAAGAAGTGGC  
 TGTTCTTCCCTTCGAGGACGACCTGAGAAGAGACCTGGGCAGGCAGTTCAGCGTGGAGAGA  
 CTGCCCGCCGTGGTGGTGTGAAGCCTGATGGCGACGTGCTGACCAGAGATGGCGCCGACGA  
 GATCCAGAGACTGGGCACCGCCTGCTTCGCCAACTGGCAGGAGGCCGCCGAGGTCTTGACA  
 35 GAACTTCCAGCTGCCCGAGGATCTGGAGGATCAGGAGCCAGATCCCTGACCGAGTGCCTG  
 AGGCGGCACAAGTACAGAGTGGAGAAGGCCGCCAGAGGCCGCGCAGAGACCCTGGCGGCGGAGG  
 AGGAGAGGAGGGCGGAGCCGGCGGACTGTTCTGATGAGCTAGCACCGGTTGTACAAGTCAAG  
 40 CGGCCAACCTCCCTAGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTG  
 GCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCACCAGCCTTGTCCTAATAAAAATTAAGTTGCATCAT  
 TTTGTCTGACTAGGTGTCCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGG  
 45 GGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCA  
 GTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAGCGATTCTCCTGCCTCA  
 GCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTT  
 50 GGTAGAGACGGGTTTTACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTCCTAATCTCAGGTGATC  
 TACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGT  
 CCTTCTGATTTTGTAGGTAACCACGTGCGGACCGAGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGA  
 GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCC  
 55 GACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGG  
 CGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACGTCAAAG  
 CAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAG  
 60 CGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTCTTCCCTTCCCTTTC  
 TCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGA  
 TTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGG  
 65 GCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTG  
 GACTCTTGTTCAAAACCTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTTTGATTTATAA

5 GGGATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGC  
 GAATTTTAACAAAAATATTAACGTTTACAATTTTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTG  
 ATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCT  
 10 TGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCA  
 GAGGTTTTACACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTT  
 TATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAAT  
 GTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAG  
 15 ACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATT  
 TCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCATTTCCTTCCCTGTTTTTTCCTCACCAGAA  
 ACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACT  
 GGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGAAGAAGCTTTTCCAATGATGA  
 GCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAA  
 20 CTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAA  
 GCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATA  
 ACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTTC  
 CACAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT  
 ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTAT  
 25 TAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGAT  
 AAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATC  
 TGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCT  
 CCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAG  
 30 ATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATA  
 TATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTT  
 TTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCC  
 GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCA  
 35 AACAAAAAACACCAGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTT  
 TTCCGAAGGTAACCTGGCTTACGACAGAGCGCAGATACCAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCG  
 TAGTTAGGCCACCACCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCT  
 GTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGAT  
 40 AGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTG  
 GAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCT  
 TCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCA  
 45 CGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTTGCCACCTC  
 TGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAG  
 CAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGT

50 SEQ ID NO:11 -secuencia del ADN genómico del vector rAAV-RdCVF1L

55 CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCCG  
 GCGACCTTTGGTCGCCC GGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTC  
 CATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCACGCGTGGAGCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGG  
GGTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCG  
CCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT  
AACGTCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACT  
 60 TGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAA  
TGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT  
CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTG

65

5 GATAGCGGTTTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTG  
TTTTGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAA  
ATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCA  
 10 GATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCA  
GCCTCCGCGGATTTCGAATCCCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGATTCCCCGTGCCAA  
GAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGCCACAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAAAT  
ATACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTTCTTTTCAGGGCAATAAT  
 15 GATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTA  
AGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTTGTAAGTGTAAAGAG  
GTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGG  
ATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTA  
 20 TCTTCCCTCCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTTGGCAAA  
GAATTGGGATTTCGAACATCGATTGAATTCGAGCCACC**ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT**  
**GGGTA**CTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGCGGCCAGCCGGCCAGGCGCGCC  
**GTACGAAGCTTGGTACCCGCCAGCCTGTT**CAGCGGCCGGATCCTGATCAGGAACAACAGCGA  
 25 **CCAGGACGAGCTGGACACCGAGGCCGAAGTGAGCAGGAGGCTGGAGAACAGACTGGTGCTGC**  
**TGTTCTTTGGCGCCGGAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTTCGTGCCATCCTGAAGGATTC**  
**TTTGTGAGGCTGACCGACGAGTTCACGTGCTGAGAGCCGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGT**  
 30 **GAGCCAGGACAGCACCGAGGAGCAGCAGGACCTGTT**CCTGAAGGACATGCCAAGAAGTGGC  
**TGTT**CCTGCCCTTCGAGGACGACCTGAGAAGAGACCTGGGCAGGCAGTTCAGCGTGGAGAGA  
**CTGCCC**CGCGTGGTGGTGTGAAGCCTGATGGCGACGTGCTGACCAGAGATGGCGCCGACGA  
 35 **GATCCAGAGACTGGGCACCGCCTGCTTCGCCAACTGGCAGGAGGCCGCCGAGGTCCTGGACA**  
**GAAACTTCAGCTGCCCCGAGGATCTGGAGGATCAGGAGCCCAGATCCCTGACCGAGTGCCTG**  
**AGGCGGCACAAGTACAGAGTGGAGAAGGCCGCCAGAGGCCGAGAGACCC**TGGCGCGGAGG  
**AGGAGAGGAGGGCGGAGCCGGCGGACTGTTCTGA**TGAGCTAGCACCGGTTGTACAAGTCAAG  
 40 CGGCCAACCCCTCCCTAGATCTACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCAGTGCCTCTCCTG  
GCCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCTAATAAAATTAAGTTGCATCAT  
 45 TTTGTCTGACTAGGTGTCTTCTATAATATTATGGGGTGGAGGGGGTGGTATGGAGCAAGG  
GGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGTCTATTGGGAACCAAGCTGGAGTGCA  
 50 GTGGCACAATCTTGGCTCACTGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCA  
GCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGCTCAGCTAATTTTTGTTTTTTT  
 55 GGTAGAGACGGGGTTTACCATATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTAATCTCAGGTGATC  
TACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGAACCACTGCTCCCTTCCCTGT  
 60 CCTTCTGATTTTGTAGGTAACCACGTGCGGACCGAGCGGCCGAGGAACCCCTAGTGATGGA  
 65 GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGTCCGCC  
GACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG

SEQ ID NO:12 - región codificante de RdCVF1L recodificada (Ejemplo 1)

50 ATGGCCAGCCTGTTTCAGCGGCCGGATCCTGATCAGGAACAACAGCGACCAGGACGAGCTGGA  
CACCGAGGCCGAAGTGAGCAGGAGGCTGGAGAACAGACTGGTGCTGCTGTTCTTTGGCGCCG  
GAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTTCGTGCCATCCTGAAGGATTTCTTTGTGAGGCTGACC  
 55 GACGAGTTCTACGTGCTGAGAGCCGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGTGAGCCAGGACAGCAC  
CGAGGAGCAGCAGGACCTGTTTCCTGAAGGACATGCCAAGAAGTGGCTGTTTCTGCCCTTCG  
AGGACGACCTGAGAAGAGACCTGGGCAGGCAGTTCAGCGTGGAGAGACTGCCCGCCGTGGT  
 60 GTGCTGAAGCCTGATGGCGACGTGCTGACCAGAGATGGCGCCGACGAGATCCAGAGACTGGG  
CACCGCCTGCTTCGCCAACTGGCAGGAGGCCGCCGAGGTCCTGGACAGAACTTCCAGCTGC  
CCGAGGATCTGGAGGATCAGGAGCCCAGATCCCTGACCGAGTGCTGAGGCGGCACAAGTAC

65 SEQ ID NO: 13 – región codificante de RdCVF1S nativa

ATGGCCTCCCTGTTCTCTGGCCGCATCCTGATCCGCAACAATAGCGACCAGGACGAGCTGGA  
TACGGAGGCTGAGGTCAGTCGCAGGCTGGAGAACCGGCTGGTGCTGCTGTTCTTTGGTGCTG  
5 GGGCTTGTCCACAGTGCCAGGCCTTCGTGCCCATCCTCAAGGACTTCTTCGTGCGGCTCACA  
GATGAGTTCTATGTACTGCGGGCGGCTCAGCTGGCCCTGGTGTACGTGTCCCAGGACTCCAC  
GGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCCCTCAAGGACATGCCAAAGAAATGGCTTTTCCTGCCCTTG  
AGGATGATCTGAGGAGGTGA

10 SEQ ID NO: 14 – una región codificante de RdCVF1S recodificada (Ejemplo 1)

ATGGCCAGCCTGTTTCAGCGGCCGGATCCTGATCAGGAACAACAGCGACCAGGACGAGCTGGA  
CACCGAGGCCGAAGTGAGCAGGAGGCTGGAGAACAGACTGGTGCTGCTGTTCTTTGGCGCCG  
15 GAGCCTGCCCTCAGTGCCAGGCCTTCGTGCCCATCCTGAAGGATTTCTTTGTGCGGCTGACC  
GACGAGTTCTACGTGCTGAGAGCCGCCAGCTGGCCCTGGTGTATGTGAGCCAGGACAGCAC  
CGAGGAGCAGCAGGACCTGTTCCCTGAAGGACATGCCCAAGAAGTGGCTGTTCCCTGCCCTTCG  
20 AGGACGACCTGCGGAGATGA

SEQ ID NO: 15 – Secuencia de cadena kappa de Iq humana  
LLWLLLLWPGSTGD

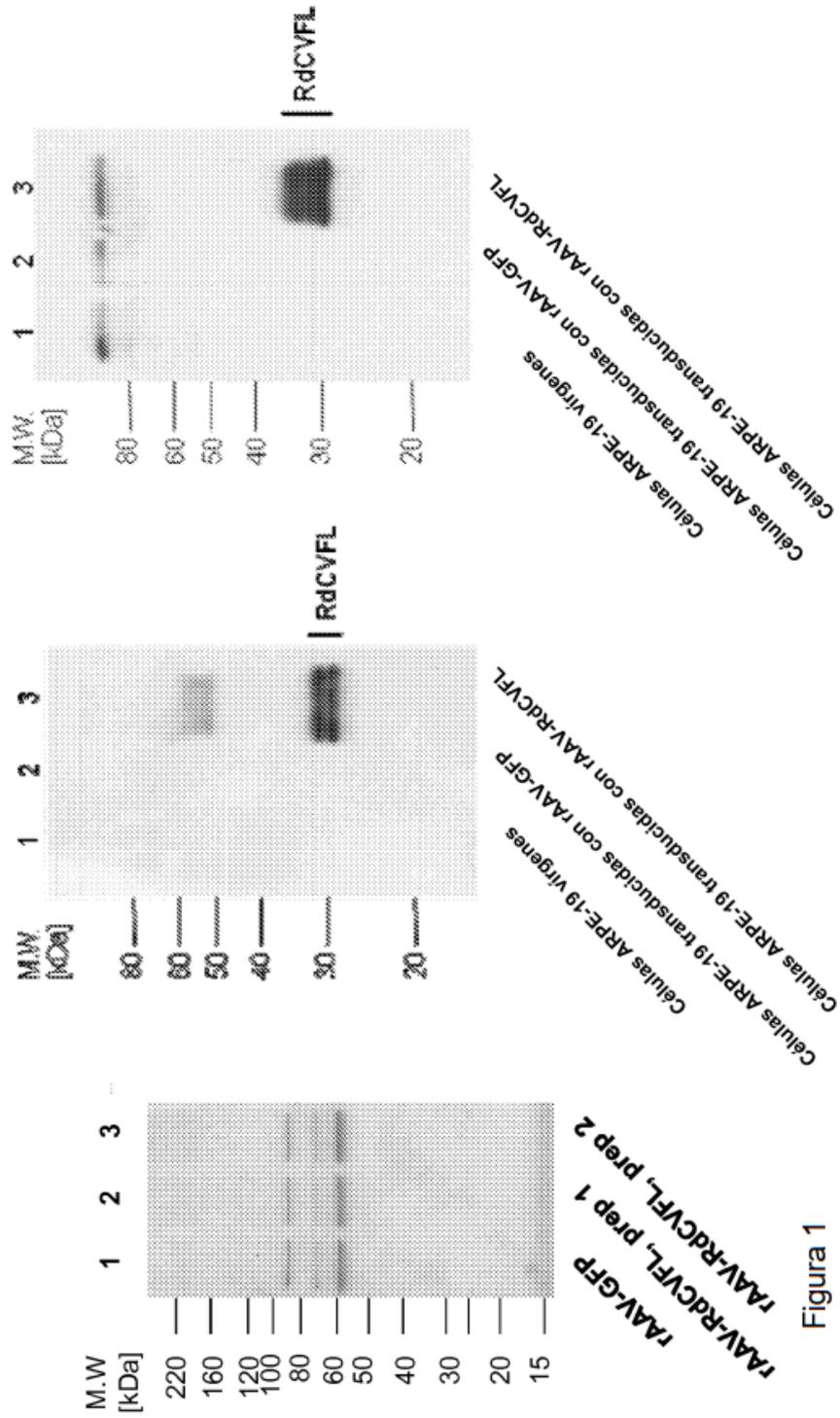
25

30

**REIVINDICACIONES**

1. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia codificante para una proteína RdCVF unida de manera operativa a una segunda secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal N-terminal, en donde la secuencia codificante de RdCVF comprende una secuencia de nucleótidos recodificada que es menos de 90 % idéntica a una secuencia de nucleótidos nativa correspondiente y en cual al menos un codón nativo se cambia a un codón diferente que codifica para el mismo aminoácido que el codón nativo; y la secuencia señal es una secuencia señal de IgK.
2. El ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 1, en donde:
  - (i) la proteína RdCVF es una proteína RdCVF1 o una proteína RdCVF2; y/o
  - (ii) la proteína RdCVF es una proteína RdCVF versión corta o una proteína RdCVF versión larga; y/o
  - (iii) la proteína RdCVF es una proteína RdCVF humana; y/o
  - (iv) la secuencia de nucleótidos recodificada carece de un codón de metionina de iniciación; y/o
  - (v) la secuencia codificante para la proteína RdCVF comprende los nucleótidos 106 a 741 de la SEQ ID NO: 1, los nucleótidos 106 a 429 de la SEQ ID NO: 1, los nucleótidos 106 a 432 de la SEQ ID NO: 3 o los nucleótidos 106 a 744 de la SEQ ID NO: 3; y/o
  - (vi) la secuencia señal:
    - (i) comprende los nucleótidos 1-105 de la SEQ ID NO: 1; o
    - (ii) codifica para una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 15, los aminoácidos 2-34 de la SEQ ID NO:2, o los aminoácidos 7-21 de la SEQ ID NO:2; y/o
  - (vii) la secuencia de nucleótidos comprende la SEQ ID NO:1 o 3; y/o
  - (viii) la secuencia de nucleótidos recodificada tiene al menos 15 % de los nucleótidos diferentes en comparación con una secuencia de nucleótidos nativa correspondiente.
3. El ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 1 o 2, en donde:
  - (a) una secuencia promotora se une de manera operativa a la secuencia codificante para la proteína RdCVF, en donde opcionalmente el promotor es un promotor de citomegalovirus (CMV), y en donde preferentemente, el promotor de CMV comprende los nucleótidos 150-812 de la SEQ ID NO:11; y/o
  - (b) una secuencia de intrón se une de manera operativa a la secuencia codificante para la proteína RdCVF, en donde opcionalmente (i) la secuencia de intrón es una secuencia de intrón de beta-globina; o (ii) la secuencia de intrón comprende los nucleótidos 820-1312 de la SEQ ID NO:11; y/o
  - (c) el ácido nucleico comprende la SEQ ID NO:11, la secuencia de nucleótidos de 150-2080 de la SEQ ID NO:11 o la secuencia de nucleótidos de 150-812, 820-1312 y 1340-2080 de la SEQ ID NO:11.
4. Un vector viral que comprende el ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde opcionalmente:
  - (a) el vector viral es un vector viral adeno-asociado (AAV), y preferentemente el vector de AAV se basa en el serotipo 2 de AAV o el serotipo 8 de AAV; y/o
  - (b) el vector viral no es un vector viral de inmunodeficiencia bovina; y/o
  - (c) el vector viral no es un vector lentiviral; y/o
  - (d) el vector viral se selecciona del grupo que consiste en un vector viral de ADN, un vector viral no envuelto y un vector adenoviral.
5. Una célula aislada que comprende el ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la célula secreta la proteína RdCVF.
6. Una preparación farmacéutica que comprende (i) un portador farmacéuticamente aceptable y (ii) el ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, el vector viral de conformidad con la reivindicación 4, la proteína RdCVF de conformidad con la reivindicación 5 o una combinación de los mismos.
7. Un método para producir una proteína RdCVF que comprende cultivar la célula de conformidad con la reivindicación 5 en condiciones que permitan la expresión y secreción de la proteína RdCVF y el aislamiento de la proteína RdCVF del cultivo celular, en donde opcionalmente dicho método comprende además la purificación de la proteína RdCVF del sobrenadante a partir del cultivo celular.
8. El ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, el vector viral de conformidad con la reivindicación 4, la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 6 o una combinación de los mismos, para su uso en un método de conservación de células oculares en el ojo de un mamífero, en donde las células oculares se seleccionan del grupo que consiste en células de bastones oculares o células de conos oculares.
9. El ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, el vector viral de conformidad con la reivindicación 4, la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 6 o una combinación de los mismos, para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde:
  - (a) el vector viral o el ácido nucleico es para administración mediante inyección subretiniana, en donde

- opcionalmente el vector viral o el ácido nucleico se administra mediante inyección intravítrea, inyección a la cámara intraanterior del ojo, inyección subconjuntiva o inyección subtenon; y/o
- (b) el mamífero es un ser humano; y/o
- 5 (c) el mamífero padece de una enfermedad ocular seleccionada del grupo que consiste en distrofia retiniana, enfermedad de Stargardt, retinitis pigmentaria, degeneración macular seca relacionada con la edad (AMD seca), atrofia geográfica (etapa avanzada de AMD seca), degeneración macular húmeda relacionada con la edad (AMD húmeda), glaucoma/hipertensión ocular, retinopatía diabética, síndrome de Bardet-Biedel, síndrome de Bassen-Kornzweig, enfermedad de Best, coroideremia atrofia girata, amaurosis congénita, síndrome de Refsun, síndrome de Usher, enfermedad ocular relacionada con la tiroides, enfermedad de Grave, una enfermedad
- 10 asociada con células epiteliales pigmentadas retinianas, enfermedad del segmento anterior, enfermedad de las lentes/cataratas, un trastorno de cápsula ocular, o uveítis y/o
- (d) antes de la administración la célula ocular conservada no contiene el ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y no se transdujo por el vector viral; y/o
- 15 (e) las células oculares se conservan en un sitio al menos 1 mm, preferentemente al menos 2 mm, del sitio la inyección subretiniana
10. Un método *in vitro* o *ex vivo* de secreción de una proteína RdCVF desde una célula que comprende administrar a la célula el ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones a(f)-(g) y 3(c) o el vector viral de conformidad con la reivindicación 4 en condiciones que permiten la expresión y secreción de RdCVF codificada por el ácido nucleico o el vector viral.
- 20
11. El método de conformidad con la reivindicación 10, en donde:
- (a) la célula es una célula de mamífero, opcionalmente una célula humana; y/o
- 25 (b)
- (i) la célula es una célula ocular, opcionalmente seleccionada del grupo que consiste en una célula epitelial pigmentada retiniana (RPE), una célula de bastón, una célula bipolar, una célula horizontal, una célula amacrina, una célula ganglionar y una célula ARPE-19; o
- (ii) la célula se selecciona del grupo que consiste en una célula 293, una célula CHO, una célula PerC6, una célula Vero, una célula BHK, una célula HeLa, una célula COS, una célula MDCK, una célula 3T3 y una
- 30 WI38; y/o
- (d) las células están encapsuladas.
12. El ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, el vector viral de conformidad con la reivindicación 4, la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 6 o una combinación de los mismos, para su uso en un método de tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson y una enfermedad olfativa en un mamífero, en donde opcionalmente el mamífero es un
- 35 ser humano.



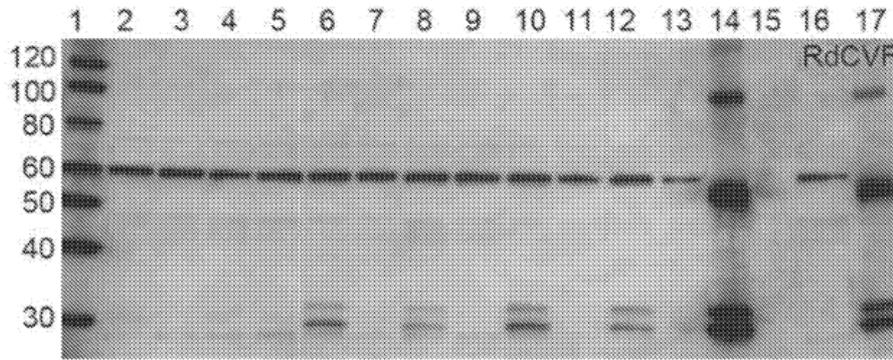


Figura 3

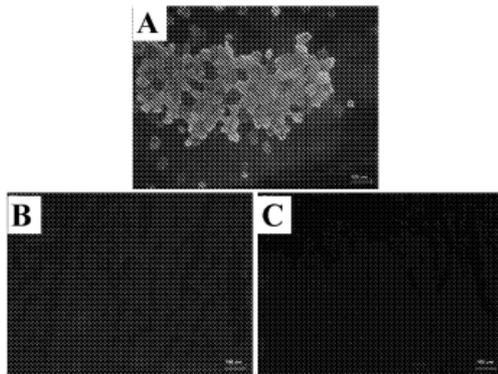


Figura 4

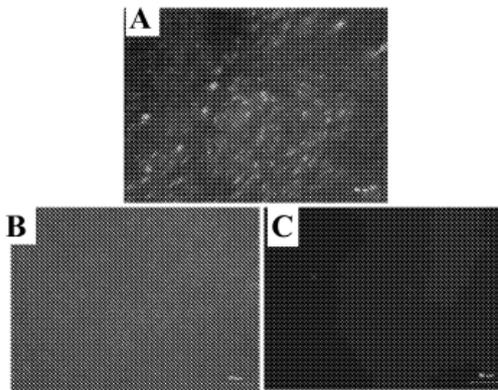


Figura 5

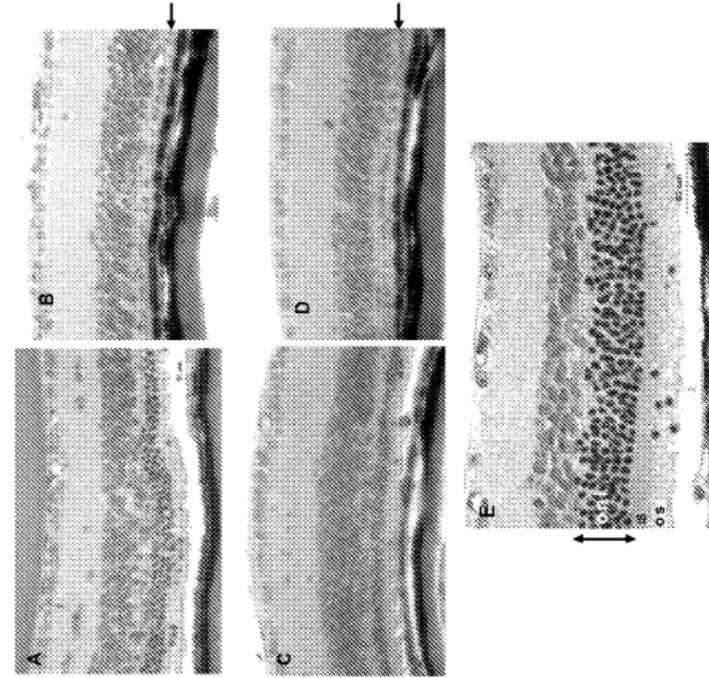


Figure 7

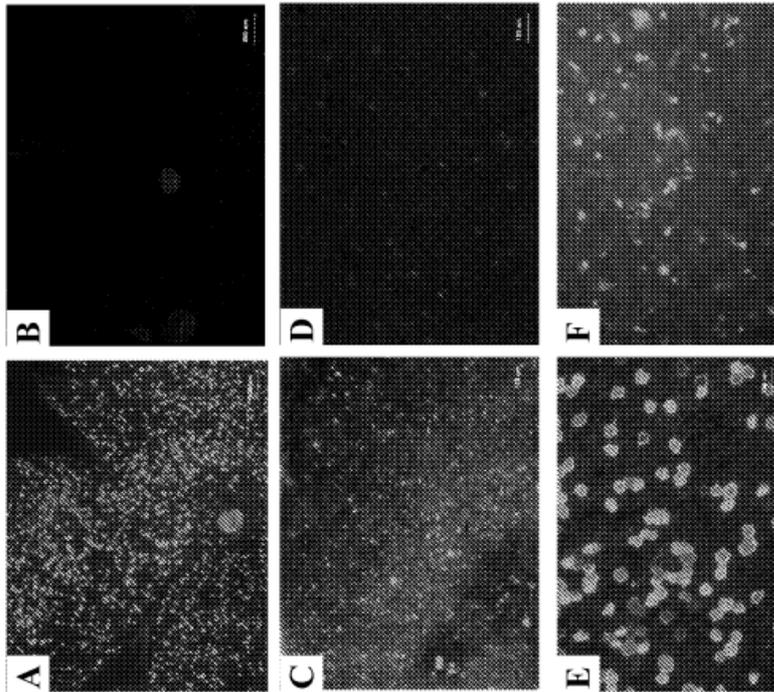


Figure 6

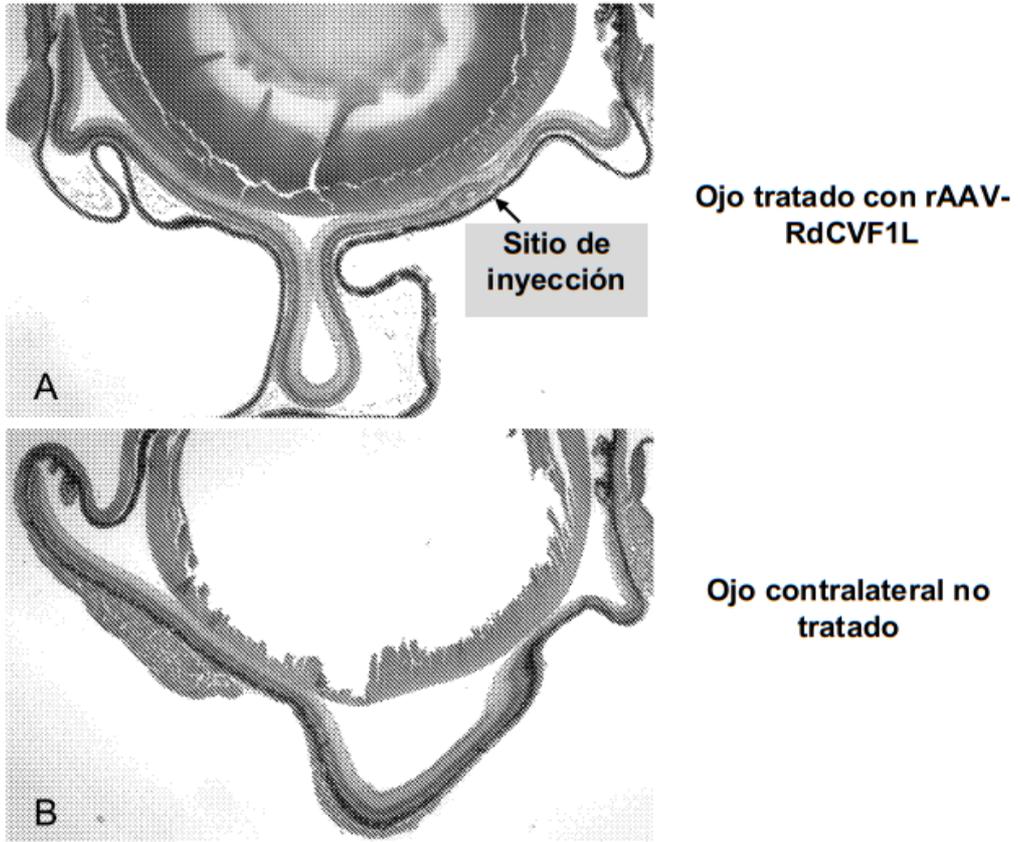


Figura 8

## ES 2 774 779 T3

```

rAAV-RdCVF1L          2788 bp   ADN   lineal
REFERENCIA      1 (bases 1 a 2788)
CARACTERÍSTICAS  Ubicación/Calificadores
  misc_feature      1..141
                   /gene="ITR"
                   /product="AAV left ITR"
                   /SECDrawAs="Region"
  CDS               150..812
                   /gene="CMV Promoter"
                   /product="CMV Promoter"
                   /SECDrawAs="Gene"
  CDS               820..1312
                   /gene="Intron"
                   /product="Human beta-globin intron"
                   /SECDrawAs="Gene"
  misc_feature      1319..1326
                   /gene="MCS"
                   /product="multiple cloning site"
                   /SECDrawAs="Region"
  CDS               1340..2080
                   /gene="IgG-k RdCVFL"
                   /product="IgG-k plus RdCVFL"
                   /SECDrawAs="Gene"
  misc_feature      2085..2129
                   /gene="MCS"
                   /product="multiple cloning site"
                   /SECDrawAs="Region"
  misc_feature      2130..2608
                   /gene="PolyA"
                   /product="PolyA"
                   /SECDrawAs="Region"
  misc_feature      2648..2788
                   /gene="ITR"
                   /product="AAV right ITR"
                   /SECDrawAs="Region"
ORIGEN
  1  cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgct
  61  gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca
  121 actccatcac taggggttcc tgcggccgca cgcgtggagc tagttattaa tagtaatcaa
  181 ttacggggtc attagtccat agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa
  241 atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg
  301 ttcccatagt aacgtcaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt
  361 aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg

```

Figura 9

ES 2 774 779 T3

```

421 tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc
481 ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc
541 agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccacccca
601 ttgacgtcaa tgggagtttg ttttgacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa
661 caactccgcc ccattgacgc aaatgggcgg taggcgtgta cgggtgggag tctatataag
721 cagagctcgt ttagtgaacc gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct
781 ccatagaaga caccgggacc gatccagcct ccgcggattc gaatcccggc cgggaacggt
841 gcattggaac ggggattccc cgtgccaaga gtgacgtaag taccgcctat agagtctata
901 ggcccacaaa aaatgctttc ttcttttaat ataacttttt gtttatctta tttotaatac
961 tttcccta at ctctttcttt cagggaata atgatacaat gtatcatgcc tctttgcacc
1021 attctaaaga ataacagtga taatttctgg gtttaaggcaa tagcaatatt tctgcatata
1081 aatatttctg catataaatt gtaactgatg taagaggttt catattgcta atagcagcta
1141 caatccagct accattctgc ttttatttta tgggtgggat aaggctggat tttctagat
1201 ccaagctagg cccttttctg aatcatgttc atacctctta tcttctctcc acagctcctg
1261 ggcaacgtgc tggctctgtg gctggcccat cactttggca aagaattggg attcgaacat
1321 cgattgaatt cgagccacca tggagacaga cacactcctg ctatgggtac tgtgctctg
1381 ggttccaggt tccactgggt acgcggccca gccggccagg cgcgcctgac taacttctga
1441 acccgcagc ctgttcagcg gccggatcct gatcaggaac aacagcgacc aggacgagct
1501 ggacaccgag gccgaagtga gcaggaggct ggagaacaga ctggtgctgc tgttctttgg
1561 cgccggagcc tgccctcagt gccaggcctt cgtgccatc ctgaaggatt tctttgtgag
1621 gctgaccgac gaggttctacg tgetgagagc cgcccagctg gcctgggtg atgtgagcca
1681 ggacagcacc gaggagcagc aggacctgtt cctgaaggac atgcccaga agtggctgtt
1741 cctgccttc gaggacgacc tgagaagaga cctgggcagg cagttcagcg tggagagact
1801 gcccgcctg gtggtgctga agcctgatgg cgactgctg accagagatg gcccgcagca
1861 gatccagaga ctgggcaccg cctgcttcgc caactggcag gaggccgccc aggtcctgga
1921 cagaaacttc cagctgcccc aggatctgga ggatcaggag cccagatccc tgaccgagtg
1981 cctgagggcg cacaagtaca gagtggagaa ggccgccaga ggcggcagag accctggcgg
2041 cggagggagg gaggagggcg gagccggcgg actgttctga tgagctagca ccggtgtgac
2101 aagtcaagcg gccaacctc cctagatcta cgggtggcat ccctgtgacc cctcccagc
2161 gcctctcctg gccctggaag ttgccactcc agtgcacc accctgtgct taataaaatt
2221 aagttgcac attttgtctg actaggtgtc cttctataat attatggggg ggaggggggt
2281 ggtatggagc aaggggcaag ttgggaagac aacctgtagg gcctgcgggg tctattggga
2341 accaagctgg agtgcagtgg cacaatcttg gctcactgca atctccgct cctgggttca
2401 agcgattctc ctgcctcagc ctcccagatt gttgggattc caggcatgca tgaccaggct
2461 cagctaattt ttgttttttt ggtagagac gggtttcacc atattggcca ggctggctc
2521 caactcctaa tctcaggtga tctaccacc ttggcctccc aaattgctgg gattacaggc
2581 gtgaaccaact gctcccttcc ctgtccttct gattttgtag gtaaccacgt gcgaccgag
2641 cggccgcagg aaccctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgtc
2701 actgagggcg ggcgacaaa ggtcggccga cgccgggct ttgcccgggc ggcctcagtg
2761 agcgagcgag cgcgcagctg cctgcagg (SEQ ID NO:11)
//

```

Figura 9 (continuación)

### Respuestas a ERG de ratones Rd10 de 5 semanas de edad tratados con AAV-RdCVFL

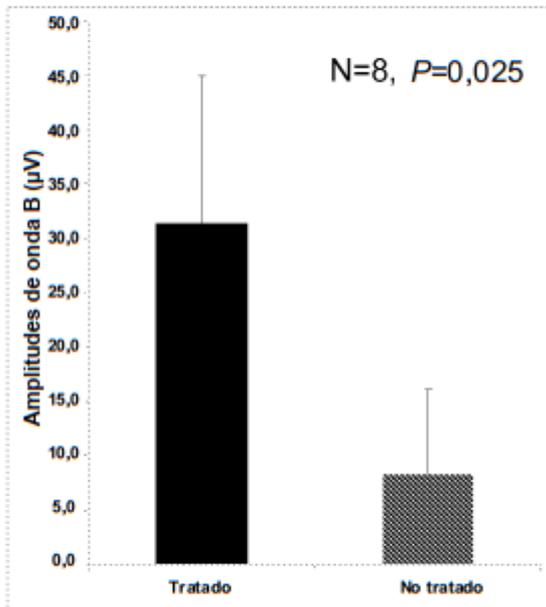


Figura 10A

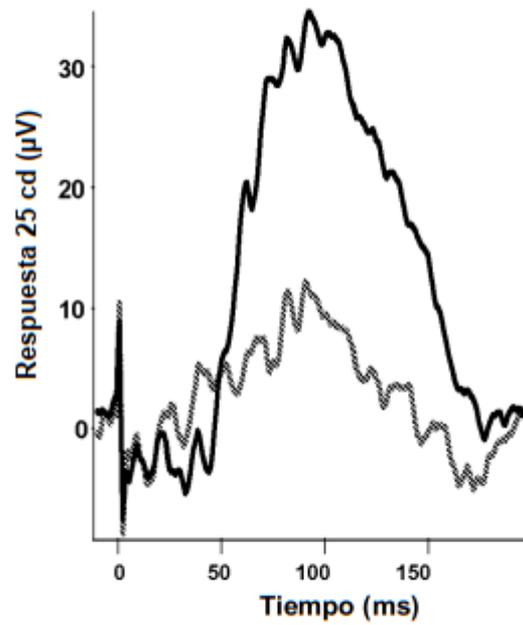


Figura 10B

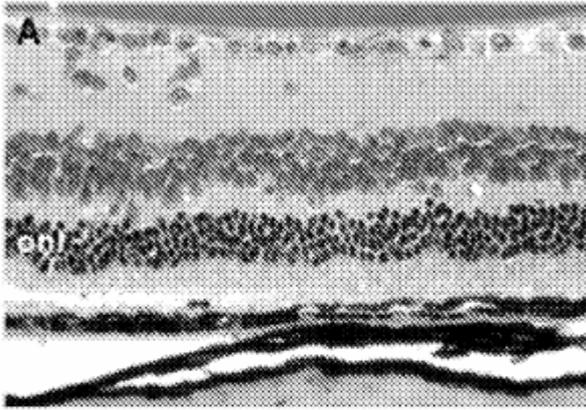


Figura 11A

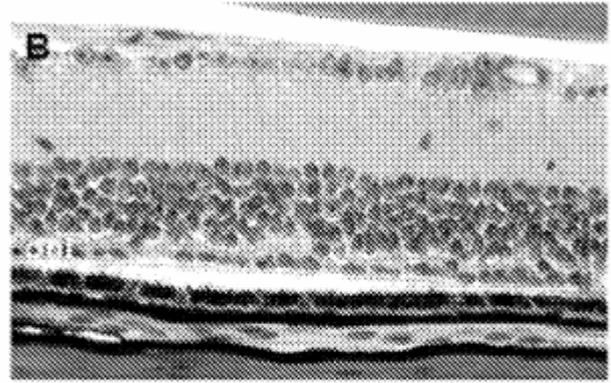


Figura 11B

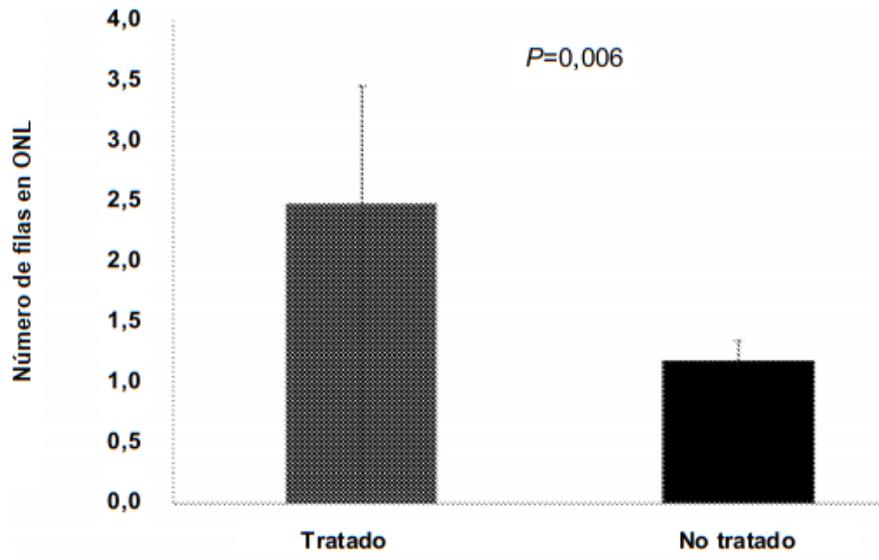


Figura 12