

PROMOTORES DE LA EXPRESIÓN ESPECÍFICA DE GENES EN FOTORRECEPTORES DE CONO

SOLICITUDES RELACIONADAS

5

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 63/397,183, presentada el 11 de agosto de 2022 y la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 63/399,824, presentada el 22 de agosto de 2022, cuyo contenido se incorpora al presente mediante esta referencia en su totalidad.

10

1. ANTECEDENTES

15

[0002] La ceguera incapacita a millones de personas en todo el mundo y constituye un importante problema de salud. Una causa común de ceguera es la disfunción de la retina y en particular de las células fotorreceptoras. Las formas más comunes de ceguera de la retina son la retinosis pigmentaria (RP) y la degeneración macular (AMD, por su sigla en inglés), que entre otras provocan una degeneración de las células fotorreceptoras y la consecuente pérdida de sensibilidad a la luz. Es necesario poder evitar los problemas asociados con dicha degeneración de los fotorreceptores o la pérdida de su sensibilidad a la luz. Esto puede realizarse preferentemente mediante la expresión de moléculas terapéuticas, en particular polipéptidos, cininas, factores tróficos, canales, opsinas o receptores, o de moléculas de ácido nucleico, específicamente en las células fotorreceptoras de cono.

20

[0003] Para la expresión, los genes recombinantes o los genes exógenos o heterólogos generalmente se transfectan en las células, poblaciones celulares o tejidos diana, típicamente como construcciones de ADNc en el contexto de un casete de expresión activo para permitir la transcripción del gen heterólogo. La construcción de ADN es reconocida por el mecanismo de transcripción celular en un proceso que implica la actividad de muchos factores de transcripción (TF) que actúan en trans en elementos reguladores en cis, incluidos potenciadores, silenciadores, aisladores y promotores, todos denominados en general «elementos reguladores». Los promotores génicos participan en todos estos niveles de regulación y actúan como determinantes en la transcripción génica al integrar las influencias de la secuencia de ADN, la unión de factores de transcripción y las características epigenéticas. Determinan, por ejemplo, la fuerza de la expresión del transgén, así como en qué tipo o tipos de células se expresará dicho transgén.

25

30

[0004] Los promotores comunes utilizados para impulsar la expresión de genes heterólogos en células de mamíferos son el promotor temprano inmediato principal del citomegalovirus (CMV) humano y de ratón.

Proporcionan una fuerte expresión y han demostrado ser robustos en varios tipos de células. Otros promotores virales, como el promotor temprano inmediato SV40 y el promotor de repetición terminal larga (LTR, por su sigla en inglés) del virus del sarcoma de Rous (RSV, por su sigla en inglés), también se utilizan con frecuencia en casetes de expresión. En lugar de promotores virales, también se pueden

5 utilizar promotores celulares. Entre los promotores conocidos se encuentran aquellos de genes de mantenimiento que codifican transcritos celulares abundantemente transcritos, como la beta-actina, el factor de elongación 1-alfa (EF-1alfa) o la ubiquitina. En comparación con los promotores virales, la expresión génica eucariota es más compleja y requiere una coordinación precisa de muchos factores diferentes.

10 **[0005]** Los aspectos de preocupación con respecto al uso de elementos reguladores endógenos para la expresión transgénica incluyen la generación de ARNm estable, y que la expresión puede tener lugar en el entorno nativo de la célula hospedadora donde se proporcionan, por consiguiente, factores de transcripción que actúan en trans. Dado que la expresión de genes eucariotas está controlada por un mecanismo complejo de elementos reguladores que actúan en cis y trans, la mayoría de los promotores

15 celulares carecen de una caracterización funcional extensa. Partes del promotor eucariota generalmente se ubican inmediatamente antes de su secuencia transcrita y sirven como punto de inicio de la transcripción. El promotor central rodea inmediatamente el sitio de inicio de la transcripción (TSS, por su sigla en inglés), lo cual es suficiente para ser reconocido por el mecanismo de transcripción. El promotor proximal comprende la región en dirección 5' del promotor central y contiene el TSS y otras características de

20 secuencia necesarias para la regulación transcripcional. Los factores de transcripción actúan de forma específica a la secuencia al unirse a motivos reguladores en la secuencia promotora y potenciadora.

[0006] Algunos promotores pueden actuar de manera específica a la célula y pueden usarse para expresar un transgén en células de un tipo específico o en células de un subconjunto particular. Sin embargo, el desarrollo de promotores para células de la retina, como los conos, se ha visto obstaculizado por una

25 especificidad relativamente baja (es decir, los promotores también pueden impulsar una expresión relativamente alta en otros tipos de células, como los bastones).

[0007] Por consiguiente, existe una necesidad de promotores con mayor especificidad para la expresión en conos.

2. COMPENDIO

30 **[0008]** Esta divulgación se refiere a ácidos nucleicos aislados que comprenden un promotor específico del cono. El promotor comprende una primera secuencia nucleotídica de al menos alrededor de 150

nucleótidos que puede tener al menos un 70 % de identidad con una secuencia de igual longitud de la secuencia de la SEQ ID NO: 1; y una segunda secuencia nucleotídica de al menos alrededor de 260 nucleótidos que tiene al menos un 70 % de identidad con una secuencia de igual longitud de la secuencia de la SEQ ID NO: 2. En modalidades, el promotor comprende una primera secuencia nucleotídica de al menos alrededor de 150 nucleótidos que puede tener al menos un 70 % de identidad con una secuencia de igual longitud de la secuencia de la SEQ ID NO: 1; y una segunda secuencia nucleotídica de al menos alrededor de 370 nucleótidos que tiene al menos un 70 % de identidad con una secuencia de igual longitud de la secuencia de la SEQ ID NO: 2.

[0009] La primera secuencia nucleotídica puede tener al menos un 70 % de identidad con una secuencia de igual longitud desde el extremo 3' de la secuencia de la SEQ ID NO: 1. La primera secuencia nucleotídica puede tener al menos un 90 % de identidad con una secuencia de igual longitud desde el extremo 3' de la secuencia de la SEQ ID NO: 1; la segunda secuencia nucleotídica puede tener al menos un 90 % de identidad con una secuencia de igual longitud desde el extremo 3' o el extremo 5' de la secuencia de la SEQ ID NO: 2, o ambos. La primera secuencia nucleotídica puede comprender desde alrededor de 150 nucleótidos hasta alrededor de 395 nucleótidos desde el extremo 3' de la secuencia de la SEQ ID NO: 1. La primera secuencia nucleotídica puede comprender la SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15.

[0010] La segunda secuencia nucleotídica puede comprender desde alrededor de 260 nucleótidos hasta alrededor de 895 nucleótidos desde el extremo 3' de la secuencia de la SEQ ID NO: 2 o alrededor de 895 nucleótidos desde el extremo 5' de la SEQ ID NO: 2. La segunda secuencia nucleotídica puede comprender la SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 30. La segunda secuencia nucleotídica puede comprender la SEQ ID NO: 39.

[0011] El ácido nucleico aislado puede comprender de 5' a 3' la primera secuencia nucleotídica y la segunda secuencia nucleotídica sin secuencias entre ellas. El ácido nucleico aislado puede comprender de 5' a 3' la segunda secuencia nucleotídica y la primera secuencia nucleotídica sin secuencias entre ellas. El ácido nucleico aislado puede comprender dos o más primeras secuencias nucleotídicas, dos o más segundas secuencias nucleotídicas o ambas.

[0012] El ácido nucleico aislado puede comprender además una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido heterólogo o un ARN heterólogo, en donde el promotor y la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido están unidos operativamente.

[0013] El ácido nucleico aislado puede comprender además un elemento regulador; en donde el promotor,

el elemento regulador y la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido heterólogo o el ARN heterólogo, si está presente, están unidos operativamente.

[0014] El elemento regulador puede ser un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE, por su sigla en inglés).

5 **[0015]** El ácido nucleico aislado puede comprender además una secuencia nucleotídica que codifica una señal de poliadenilación (PoliA) que está 3' de la secuencia nucleotídica que codifica el elemento regulador; en donde la secuencia nucleotídica que codifica la PoliA y la secuencia nucleotídica que codifica el elemento regulador están unidas operativamente.

10 **[0016]** El ácido nucleico aislado puede comprender una primera secuencia de repetición terminal invertida (ITR, por su sigla en inglés) de AAV que está 5' del promotor y una segunda AAV ITR que está 3' del elemento regulador y, preferentemente, 3' de la señal de PoliA.

[0017] El ácido nucleico aislado puede comprender además una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV.

15 **[0018]** Esta divulgación también se refiere a un ácido nucleico aislado, que comprende un promotor específico del cono, el promotor comprende una primera secuencia nucleotídica de al menos alrededor de 150 nucleótidos y no más de 499 nucleótidos que puede tener al menos un 70 % de identidad con una secuencia de igual longitud a la secuencia de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el promotor específico del cono puede ser la SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad con cualquiera de las anteriores. Por ejemplo, el promotor
20 específico del cono puede ser la SEQ ID NO: 40 o una secuencia que tenga al menos un 70 % de identidad con cualquiera de las anteriores.

[0019] Esta divulgación se refiere además a un vector que comprende cualquier ácido nucleico aislado como se describe en este documento.

[0020] El vector puede comprender además una cápside viral.

25 **[0021]** La cápside viral puede ser una cápside de vector viral adenoasociado (AAV) seleccionada del grupo que consiste en la cápside de AAV8-BP2, la cápside de AAV-PHP.B, la cápside de AAV-PHP.eB, la cápside de AAV5 o la cápside de AAV-NHP26.

[0022] En este documento se divulga una célula hospedadora que comprende un vector descrito en el presente documento.

30 **[0023]** La divulgación también se refiere a kits que comprenden un ácido nucleico aislado, un vector, una célula hospedadora, o dos o más de estos.

[0024] Esta divulgación también se refiere a un método para expresar un polipéptido heterólogo o un ARN heterólogo en un organoide de la retina, un explante de la retina o un sujeto mamífero. El método puede comprender administrar al organoide de la retina, al explante de la retina o al sujeto mamífero un ácido nucleico aislado, un vector, una célula hospedadora o dos o más de estos.

5

3. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0025] La FIG. 1 representa esquemáticamente construcciones de ácidos nucleicos en las que se estudiaron los promotores de ProA7 y ProA7 truncado en el Ejemplo 1.

10 [0026] La FIG. 2 muestra proyecciones Z de intensidad máxima de imágenes en vivo de organoides completos de organoides de la retina humanos transducidos con AAV, que suministran construcciones que comprenden promotores de ProA7 o ProA7 truncados como se indica.

[0027] Las FIG. 3A-3C muestran gráficos de cuantificación de imágenes en vivo de organoides completos para construcciones que comprenden promotores de ProA7 o ProA7 truncados como se indica. La FIG. 3A muestra la cantidad de células que expresan GFP detectadas por pocillo. La FIG. 3B muestra la densidad calculada de células que expresan GFP por mm². La FIG. 3C muestra la intensidad media de GFP en las células detectadas en unidades fluorescentes relativas (RFU). El experimento se realizó por triplicado, excepto para ProA7 (6 réplicas).

20 [0028] La FIG. 4 muestra imágenes de microscopio confocal de disco giratorio de cortes transversales de organoides de la retina humanos infectados con AAV-ProA7-GFP (fila superior), AAV-ProA7 5'3-GFP (fila central) o AAV-ProA7 5'6-GFP (fila inferior). Columna izquierda: GFP (verde). Columna central, inmunotinción con marcador de cono CAR (magenta). Columna derecha: GFP y marcador de cono (superposición de señales visible en blanco).

[0029] La FIG. 5 representa esquemáticamente los ácidos nucleicos para la generación de AAV: pAAV-{ProA7/Pro572/Pro573/Pro572.2/Pro573.2}-GFP-WPRE-hGHpA.

25 [0030] Las FIG. 6A-6C presentan gráficos de cuantificación de imágenes en vivo de organoides completos para construcciones que comprenden promotores de ProA7 o ProA7 truncados/específicos de bastones como se indica. La FIG. 6A muestra la cantidad de células que expresan GFP detectadas por pocillo. La FIG. 6B muestra la densidad calculada de células que expresan GFP por mm². La FIG. 6C muestra la intensidad media de GFP en las células detectadas en unidades fluorescentes relativas (RFU).
30 El experimento se realizó por triplicado.

[0031] La FIG. 7 muestra imágenes de microscopio confocal de disco giratorio de cortes transversales de

organoides de la retina humanos infectados con AAV-Pro572-GFP y AAV-Pro573-GFP, respectivamente. Izquierda: GFP (verde). Centro izquierda, inmunotinción con marcador de cono CAR (magenta). Centro derecha: GFP y marcador de cono (superposición de señales visible en blanco). Derecha: GFP y marcador de cono y tinción nuclear (Hoechst, blanco).

5 [0032] Las **FIG. 8A-8B** son gráficos que muestran que la expresión transgénica de las variantes del promotor híbrido sigue siendo específica a los fotorreceptores del cono. La **FIG. 8A** muestra un gráfico de cuantificación de la expresión en cortes transversales de organoides de la retina humanos infectados por AAV- $\{\text{Pro572/Pro572.2/Pro573/Pro573.2}\}$ -GFP y AAV-ProA7-GFP. Cuantificación de la densidad de células GFP+ como porcentaje de la densidad de fotorreceptores del cono; los valores son la media $\pm$ sem de n = 10 imágenes confocales. La **FIG. 8B** muestra la cuantificación de la especificidad del direccionamiento a AAV mostrada como un porcentaje de los tipos o clases de células de conos (negro, Conos (CAR+)) y tipos de células secundarias (gris, Otros) entre las células que expresan GFP en organoides infectados por AAV-Pro572.2-GFP y AAV-Pro573.2-GFP, respectivamente.

15 [0033] La **FIG. 9A-9C** son gráficos que muestran los resultados de un análisis de cápside utilizando cápsides de AAV5 y AAVPHP.eB y promotores que impulsan la expresión de un transgén EGFP después de la transducción de explantes de retina humana. Los vectores analizados fueron: AAV5-Pro572.2-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-Pro572.2-EGFP-WPRE, AAV5-Pro573.2-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-Pro573.3-EGFP-WPRE, AAV5-ProSC-EGFP-WPRE y AAV5-ProA7-EGFP-WPRE. La **FIG. 9A** y la **FIG. 9B** muestran la cuantificación del porcentaje de fotorreceptores del cono y bastones totales que expresan GFP bajo el control de los promotores híbridos Pro572.2 o Pro573.2 o promotores específicos del cono ProSC o ProA7, con una alta eficacia (más del 95 %) para dirigirse a los fotorreceptores del cono para los promotores de Pro572.2, Pro573.2 y ProSC en explantes de retina humana. La **FIG. 9C** muestra una intensidad media 3 veces mayor de la señal de GFP para los explantes de retina humana tratados con AAV5-Pro573.2-EGFP-WPRE que para los tratados con AAV5-ProSC-EGFP-WPRE.

25 [0034] La **FIG. 10.** muestra un gráfico de cuantificación de imágenes en vivo de organoides de la retina humanos completos de células que expresan GFP después de la transducción con vectores de AAV5 y AAVPHP.eB que contienen cantidades variables de copias del promotor a una dosis de $1\text{E}10$ y $1\text{E}11$ genomas virales (v.g) por pocillo. Los vectores probados fueron: AAVPHP.eB-ProA7-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-ProSC-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-2xProSC-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-3xProSC-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-4xProSC-EGFP-WPRE, AAV5-ProA330-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-2xmin330-EGFP-WPRE, AAVPhP.eB-3xmin330-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-4xmin330-EGFP-

WPPE, AAVPHP.eB-330-3del1del5-EGFP-WPRE y AAVPHP.eB-3del1del6-EGFP-WPRE. Los controles negativos incluyen ningún AAV (Ctrl-noAAV) y AAV5-noPro-EGFP-WPRE (Ctrl-noP).

[0035] La FIG. 11A-11B son gráficos que muestran AAVPHP.eB-4xProSC-EGFP-WPRE que incluye un promotor de ProSC multimerizado 4x que permanece específico para fotorreceptores del cono. La FIG.

11A muestra un gráfico de cuantificación para la expresión en preparaciones completas de explantes de retina humana cultivados infectados con AAVPHP.eB-ProA7-EGFP-WPRE y AAVPHP.eB-4xProSC-EGFP-WPRE. Cuantificación de la densidad de células GFP+ como porcentaje de la densidad de fotorreceptores del cono. La FIG. 11B muestra un gráfico de cuantificación de la especificidad de direccionamiento a AAV que se muestra como porcentaje de tipos o clases de células principales (círculo, Conos) y secundarios (cuadrado, Otros) entre las células que expresan GFP en la retina humana infectada por AAVPHP.eB-ProA7-EGFP-WPRE y AAVPHP.eB-4xProSC-EGFP-WPRE, respectivamente.

[0036] La FIG. 12 muestra imágenes de microscopio confocal de disco giratorio de cortes transversales de organoides de la retina humanos transducidos con AAVPHP.eB-ProSC-EGFP-WPRE y AAVPHP.eB-4xProSC-EGFP-WPRE. Izquierda: GFP. Centro izquierda, inmunotinción con marcador de cono CAR. Centro-derecha: inmunotinción con un marcador de bastón NRL, GFP y un marcador de cono. Derecha: GFP y marcador de cono y tinción nuclear.

4. DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0037] Todas las publicaciones y las patentes citadas en la presente divulgación se incorporan mediante referencia en su totalidad. En la medida en que el material incorporado mediante referencia contradiga o sea incompatible con esta memoria descriptiva, la memoria descriptiva sustituirá a dicho material. Citar cualquier referencia en el presente documento no supone la admisión de que dichas referencias sean la técnica previa de la presente divulgación. Cuando se expresa un intervalo de valores, incluye modalidades que usan cualquier valor particular dentro del intervalo. Además, la referencia a los valores establecidos en los intervalos incluye todos y cada uno de los valores dentro de ese intervalo. Todos los intervalos incluyen sus extremos y son combinables. Cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente «alrededor de», se pretende que el valor particular forme otra modalidad.

[0038] A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones se utilizan diversos términos que se refieren a los aspectos de la descripción. A tales términos se les debe dar su significado ordinario en la técnica a menos que se indique lo contrario. Otros términos definidos específicamente se interpretarán de modo coherente con las definiciones proporcionadas en el presente. Las técnicas y los procedimientos descritos o a los que se hace referencia en el presente documento son generalmente bien comprendidos y

comúnmente empleados utilizando metodologías convencionales por los expertos en la materia, como, por ejemplo, las metodologías de clonación molecular ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 4.^a ed. (2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Según corresponda, los procedimientos que implican el uso de kits y reactivos disponibles en el mercado generalmente se llevan a cabo de acuerdo con los protocolos y condiciones definidos por el fabricante, a menos que se indique lo contrario.

[0039] Tal como se usan en la presente, las formas singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen también las formas plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Los términos «incluye», «como» y similares pretenden transmitir una inclusión sin limitaciones, a menos que se indique específicamente lo contrario.

[0040] A menos que se indique lo contrario, los términos «al menos», «menos que» y «alrededor de», o términos similares que preceden a una serie de elementos o un intervalo, se entenderán referidos a cada elemento de la serie o intervalo. Los expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar utilizando no más que los experimentos habituales muchos equivalentes de modalidades específicas de la invención descrita en la presente. Dichos equivalentes se pretende que estén dentro del alcance de las reivindicaciones que siguen.

[0041] El término «sujeto», como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier animal, como cualquier mamífero, incluidos, entre otros, humanos, primates no humanos, roedores, mamíferos que se tienen comúnmente como mascotas (por ejemplo, perros y gatos, entre otros), ganado (por ejemplo, ganado vacuno, ovejas, cabras, cerdos, caballos y camellos, entre otros) y similares. En algunas modalidades, el mamífero es un ratón. En algunas modalidades, el mamífero es un humano.

[0042] El término «específico del cono», como se utiliza en este documento, describe un promotor que tiene actividad promotora en fotorreceptores del cono humanos que es al menos alrededor del 90 % selectivo para conos humanos con respecto a bastones humanos. Por ejemplo, el promotor puede tener al menos alrededor de un 91 % de selectividad, al menos alrededor de un 92 % de selectividad, al menos alrededor de un 93 % de selectividad, al menos alrededor de un 94 % de selectividad, al menos alrededor de un 95 % de selectividad, al menos alrededor de un 96 % de selectividad, al menos alrededor de un 97 % de selectividad, al menos alrededor de un 98 % de selectividad, al menos alrededor de un 99 % de selectividad o un 100 % de selectividad para conos con respecto a bastones. La selectividad de un promotor en fotorreceptores del cono humanos en relación con otras células, tales como fotorreceptores del bastón humanos, se puede determinar utilizando métodos adecuados que son conocidos por un experto

en la técnica. En un método preferido, un organoide de la retina o tejido de la retina que contiene conos y bastones se transduce con una construcción de ácido nucleico que contiene el promotor unido operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una molécula indicadora, tal como tdTomato, proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP, por su sigla en inglés), citrina, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente cian, proteína fluorescente roja o una variante funcional de estas; los organoides se cortan y se inmunotiñen para identificar conos y/o bastones utilizando un anticuerpo específico del tipo de célula (por ejemplo, antiarrestina de cono humana para conos, antirrodopsina humana para bastones); la actividad promotora se evalúa contando las células que expresan la molécula indicadora; y se determinan las fracciones de células que expresan el indicador que están co-
10 marcadas con cada anticuerpo específico del tipo de célula. La especificidad del cono se calcula como la fracción o porcentaje del total de células que expresan el indicador que son conos.

[0043] Los inventores han observado que los promotores sintéticos específicos del cono descritos en este documento son específicos del cono en humanos y en al menos una especie de primate no humano (macacos). Los promotores pueden tener menor selectividad para los conos de mamíferos no primates.

15 **[0044]** El término «específico del bastón», como se utiliza en este documento, describe un promotor que tiene actividad promotora en fotorreceptores del bastón humanos que es al menos alrededor del 90 % selectivo para bastones humanos con respecto a conos humanos. Por ejemplo, el promotor puede tener al menos alrededor de un 91 % de selectividad, al menos alrededor de un 92 % de selectividad, al menos alrededor de un 93 % de selectividad, al menos alrededor de un 94 % de selectividad, al menos alrededor de un 95 % de selectividad, al menos alrededor de un 96 % de selectividad, al menos alrededor de un 97 %
20 de selectividad, al menos alrededor de un 98 % de selectividad, al menos alrededor de un 99 % de selectividad o un 100 % de selectividad para bastones con respecto a conos. La selectividad de un promotor en fotorreceptores del bastón humanos en relación con otras células, tales como fotorreceptores del cono humanos, se puede determinar utilizando métodos adecuados que son conocidos por un experto
25 en la técnica. En un método preferido, un organoide de la retina o tejido de la retina que contiene bastones y conos se transduce con una construcción de ácido nucleico que contiene el promotor unido operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una molécula indicadora, tal como tdTomato, proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP, por su sigla en inglés), citrina, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente cian, proteína fluorescente roja o una variante funcional
30 de estas; los organoides se cortan y se inmunotiñen para identificar bastones y/o conos utilizando un anticuerpo específico del tipo de célula (por ejemplo, antiarrestina de cono humana para conos,

antirrodopsina humana para bastones); la actividad promotora se evalúa contando las células que expresan la molécula indicadora; y se determinan las fracciones de células que expresan el indicador que están comarcadas con cada anticuerpo específico del tipo de célula. La especificidad del bastón se calcula como la fracción o porcentaje del total de células que expresan el indicador que son bastones.

5 [0045] El nivel de actividad de un promotor en un tipo de célula de interés puede determinarse mediante la transducción de una población adecuada de células (p. ej., un organoide de la retina humano) con una construcción de ácido nucleico que contiene el promotor unido operativamente a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una molécula indicadora, tal como tdTomato, proteína fluorescente amarilla potenciada (EYFP), citrina, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente cian, proteína fluorescente roja o una variante funcional de estas; los organoides se cortan y se inmunotiñen para
10 identificar células del tipo de célula de interés utilizando un anticuerpo específico del tipo de célula (por ejemplo, antiarrestina de cono humana para conos, antirrodopsina humana para bastones); contar la cantidad de células del tipo de célula de interés; y contar la cantidad de células del tipo de célula de interés que expresan la molécula indicadora. La actividad promotora en las células del tipo de célula de interés se
15 calcula como la fracción o porcentaje de células del tipo de célula de interés que expresan la molécula indicadora.

[0046] En el presente se proporciona una descripción adicional de los métodos y una guía para poner en práctica los métodos.

A. Promotores

20 [0047] La presente divulgación se refiere a promotores sintéticos que son específicos del cono y pueden impulsar la expresión de un ácido nucleico deseado (por ejemplo, un transgén) en células fotorreceptoras del cono. Los promotores sintéticos pueden incluir un primer componente (una primera secuencia nucleotídica) que se deriva de un promotor específico del cono, tal como (SEQ ID NO:1), y un segundo componente (una segunda secuencia nucleotídica) que se deriva de un promotor específico del bastón, tal
25 como la SEQ ID NO:2, con el primer y segundo componentes unidos operativamente. Los inventores han descubierto sorprendentemente que dichos promotores sintéticos son inesperadamente específicos del cono y han aumentado la actividad promotora en los conos humanos en relación con el promotor específico del cono del que deriva el primer componente (primera secuencia nucleotídica) (por ejemplo, la SEQ ID NO:1).

30 [0048] Los promotores sintéticos específicos del cono descritos en el presente documento pueden comprender un fragmento activo del promotor específico del cono de la SEQ ID NO: 1, con la condición

de que el promotor sintético de esta divulgación no sea la SEQ ID NO: 1. Dichos promotores sintéticos no incluyen una secuencia nucleotídica derivada de un promotor específico del bastón, como la SEQ ID NO: 2. Los inventores determinaron inesperadamente que dichos promotores sintéticos específicos del cono pueden tener una actividad promotora aumentada en conos humanos en comparación con la SEQ ID NO: 1.

[0049] Los promotores sintéticos de esta divulgación incluyen una primera secuencia nucleotídica que tiene actividad promotora específica del cono. Ejemplos específicos de la primera secuencia nucleotídica incluyen la SEQ ID NO: 1 y secuencias de al menos alrededor de 150 nucleótidos que tienen al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 a lo largo de la primera secuencia nucleotídica. La primera secuencia nucleotídica se describe con más detalle en este documento. Los promotores sintéticos pueden consistir esencialmente en la primera secuencia nucleotídica, es decir, pueden comprender la primera secuencia nucleotídica y omitir una segunda secuencia nucleotídica como se describe en este documento.

[0050] Los promotores sintéticos pueden comprender una primera secuencia nucleotídica, como se describe aquí, y comprender además una segunda secuencia nucleotídica, como se describe aquí, que está unida operativamente a la primera secuencia nucleotídica. La primera secuencia nucleotídica y la segunda secuencia nucleotídica unidas operativamente funcionan como un único promotor para la expresión en los fotorreceptores del cono. Los promotores que comprenden tanto la primera secuencia nucleotídica como la segunda secuencia nucleotídica pueden denominarse en el presente documento promotores híbridos.

[0051] La primera y la segunda secuencias nucleotídicas normalmente se obtienen o derivan de promotores distintos, específicos del cono y del bastón, respectivamente. Como se describe y ejemplifica en este documento, los inventores descubrieron que dichos promotores híbridos sorprendentemente tienen actividad específica del cono y pueden dar como resultado altos niveles de expresión en células fotorreceptoras del cono en comparación con el promotor específico del cono del cual se deriva la primera secuencia nucleotídica. Como se muestra en este documento, cuando el primer polinucleótido es el promotor específico del cono de la SEQ ID NO: 1 o un fragmento de secuencia funcional de la región 3' de la SEQ ID NO:1, y la segunda secuencia nucleotídica es el promotor específico del bastón (SEQ ID NO:2) o un fragmento de secuencia funcional de este, el promotor híbrido fue específico del cono e impulsó una mayor expresión de un indicador (GFP) en los conos que la SEQ ID NO:1 sola. Ver, por ejemplo, la FIG. 6. Por consiguiente, esta divulgación se refiere a promotores sintéticos, que incluyen, entre otros, promotores híbridos, ácidos nucleicos que incluyen los promotores sintéticos y métodos de uso de dichos ácidos nucleicos.

a. Primera secuencia nucleotídica

[0052] Los ácidos nucleicos divulgados en este documento pueden comprender un promotor sintético que comprende una primera secuencia nucleotídica de al menos alrededor de 150 nucleótidos que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 a lo largo de la primera secuencia nucleotídica.

5 [0053] Se sabe que el promotor de ProA7 (SEQ ID NO: 1) es útil para impulsar la expresión de genes deseados en la retina de una variedad de especies. ProA7 es específico del cono y no genera una expresión sustancial en otras células de la retina. Ver, por ejemplo, Jüttner et al. Nature Neuroscience 22,1345-1356 (2019).

10 [0054] Como tal, la primera secuencia nucleotídica tiene una actividad promotora que es específica para los conos y puede impulsar la expresión en los conos humanos, por ejemplo, los conos que están inactivos y ya no responden a la luz. La primera secuencia nucleotídica puede tener actividad promotora en conos humanos, por ejemplo, conos de la retina in vivo, en explantes de retina u organoides de la retina. En algunos casos, la primera secuencia nucleotídica no tiene una actividad promotora sustancial en otras células de la retina humana, como los bastones (por ejemplo, menos de alrededor del 10 % de la actividad
15 promotora se observa en células que no son conos).

[0055] La secuencia promotora de ProA7 de la SEQ ID NO: 1 se ha descrito en la publicación internacional n.º WO2017046084. La primera secuencia nucleotídica puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. La primera secuencia puede tener una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor del 70 %, al menos
20 alrededor del 71 %, al menos alrededor del 72 %, al menos alrededor del 73 %, al menos alrededor del 74 %, al menos alrededor del 75 %, al menos alrededor del 76 %, al menos alrededor del 77 %, al menos alrededor del 78 %, al menos alrededor del 79 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 81 %, al menos alrededor del 82 %, al menos alrededor del 83 %, al menos alrededor del 84 %, al menos alrededor del 85 %, al menos alrededor del 86 %, al menos alrededor del 87 %, al menos alrededor del
25 88 %, al menos alrededor del 89 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 91 %, al menos alrededor del 92 %, al menos alrededor del 93 %, al menos alrededor del 94 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 %, al menos alrededor del 99 % o mayor identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 a lo largo de la longitud de la primera secuencia nucleotídica.

30 [0056] Si se desea, la primera secuencia nucleotídica puede ser una variante de la SEQ ID NO: 1 que conserva la actividad promotora específica del cono, ya sea sola o en combinación con la segunda

secuencia nucleotídica opcional. La primera secuencia nucleotídica puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20 o más alteraciones de ácidos nucleicos, por ejemplo, sustituciones o deleciones, en comparación con la SEQ ID NO: 1, o en el caso de un fragmento funcional de ProA7, en comparación con la porción correspondiente de la SEQ ID NO: 1.

[0057] El promotor puede comprender una primera secuencia nucleotídica que comprende una secuencia de al menos 150 nucleótidos que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, preferentemente el extremo 3' de la SEQ ID NO:1. Como se muestra en este documento, dichos fragmentos de la SEQ ID NO:1 conservan la actividad promotora específica del cono.

[0058] La primera secuencia nucleotídica puede comprender una secuencia que tenga al menos un 70 % de identidad con una secuencia de igual longitud desde el extremo 3' de la SEQ ID NO: 1. Una primera secuencia puede considerarse un truncamiento en 5' de la SEQ ID NO: 1, porque se han eliminado nucleótidos del extremo 5' de la SEQ ID NO: 1 para llegar a la primera secuencia.

[0059] Una primera secuencia nucleotídica puede ser un truncamiento en 5' de la SEQ ID NO: 1 y puede contener menos de 500 nt de ProA7, debido a la deleción de nucleótidos en el extremo 5'. Por ejemplo, la primera secuencia nucleotídica puede ser la misma que los nucleótidos 386-500 de la SEQ ID NO: 1 o puede ser la misma que los nucleótidos 2-500 de la SEQ ID NO: 1. Dicha primera secuencia nucleotídica puede comprender cualquier cantidad de nucleótidos de 150 a 499 (es decir, uno menos que la longitud de la SEQ ID NO: 1).

[0060] Por ejemplo, la primera secuencia nucleotídica puede comprender alrededor de 150 nucleótidos (nt), alrededor de 151 nt, alrededor de 152 nt, alrededor de 153 nt, alrededor de 154 nt, alrededor de 155 nt, alrededor de 156 nt, alrededor de 157 nt, alrededor de 158 nt, alrededor de 159 nt, alrededor de 160 nt, alrededor de 161 nt, alrededor de 162 nt, alrededor de 163 nt, alrededor de 164 nt, alrededor de 165 nt, alrededor de 166 nt, alrededor de 167 nt, alrededor de 168 nt, alrededor de 169 nt, alrededor de 170 nt, alrededor de 171 nt, alrededor de 172 nt, alrededor de 173 nt, alrededor de 174 nt, alrededor de 175 nt, alrededor de 176 nt, alrededor de 177 nt, alrededor de 178 nt, alrededor de 179 nt, alrededor de 180 nt, alrededor de 181 nt, alrededor de 182 nt, alrededor de 183 nt, alrededor de 184 nt, alrededor de 185 nt, alrededor de 186 nt, alrededor de 187 nt, alrededor de 188 nt, alrededor de 189 nt, alrededor de 190 nt, alrededor de 191 nt, alrededor de 192 nt, alrededor de 193 nt, alrededor de 194 nt, alrededor de 195 nt,

alrededor de 196 nt, alrededor de 197 nt, alrededor de 198 nt, alrededor de 199 nt, alrededor de 200 nt,
alrededor de 201 nt, alrededor de 202 nt, alrededor de 203 nt, alrededor de 204 nt, alrededor de 205 nt,
alrededor de 206 nt, alrededor de 207 nt, alrededor de 208 nt, alrededor de 209 nt, alrededor de 210 nt,
alrededor de 211 nt, alrededor de 212 nt, alrededor de 213 nt, alrededor de 214 nt, alrededor de 215 nt,
5 alrededor de 216 nt, alrededor de 217 nt, alrededor de 218 nt, alrededor de 219 nt, alrededor de 220 nt,
alrededor de 221 nt, alrededor de 222 nt, alrededor de 223 nt, alrededor de 224 nt, alrededor de 225 nt,
alrededor de 226 nt, alrededor de 227 nt, alrededor de 228 nt, alrededor de 229 nt, alrededor de 230 nt,
alrededor de 231 nt, alrededor de 232 nt, alrededor de 233 nt, alrededor de 234 nt, alrededor de 235 nt,
alrededor de 236 nt, alrededor de 237 nt, alrededor de 238 nt, alrededor de 239 nt, alrededor de 240 nt,
10 alrededor de 241 nt, alrededor de 242 nt, alrededor de 243 nt, alrededor de 244 nt, alrededor de 245 nt,
alrededor de 246 nt, alrededor de 247 nt, alrededor de 248 nt, alrededor de 249 nt, alrededor de 250 nt,
alrededor de 251 nt, alrededor de 252 nt, alrededor de 253 nt, alrededor de 254 nt, alrededor de 255 nt,
alrededor de 256 nt, alrededor de 257 nt, alrededor de 258 nt, alrededor de 259 nt, alrededor de 260 nt,
alrededor de 261 nt, alrededor de 262 nt, alrededor de 263 nt, alrededor de 264 nt, alrededor de 265 nt,
15 alrededor de 266 nt, alrededor de 267 nt, alrededor de 268 nt, alrededor de 269 nt, alrededor de 270 nt,
alrededor de 271 nt, alrededor de 272 nt, alrededor de 273 nt, alrededor de 274 nt, alrededor de 275 nt,
alrededor de 276 nt, alrededor de 277 nt, alrededor de 278 nt, alrededor de 279 nt, alrededor de 280 nt,
alrededor de 281 nt, alrededor de 282 nt, alrededor de 283 nt, alrededor de 284 nt, alrededor de 285 nt,
alrededor de 286 nt, alrededor de 287 nt, alrededor de 288 nt, alrededor de 289 nt, alrededor de 290 nt,
20 alrededor de 291 nt, alrededor de 292 nt, alrededor de 293 nt, alrededor de 294 nt, alrededor de 295 nt,
alrededor de 296 nt, alrededor de 297 nt, alrededor de 298 nt, alrededor de 299 nt, alrededor de 300 nt,
alrededor de 301 nt, alrededor de 302 nt, alrededor de 303 nt, alrededor de 304 nt, alrededor de 305 nt,
alrededor de 306 nt, alrededor de 307 nt, alrededor de 308 nt, alrededor de 309 nt, alrededor de 310 nt,
alrededor de 311 nt, alrededor de 312 nt, alrededor de 313 nt, alrededor de 314 nt, alrededor de 315 nt,
25 alrededor de 316 nt, alrededor de 317 nt, alrededor de 318 nt, alrededor de 319 nt, alrededor de 320 nt,
alrededor de 321 nt, alrededor de 322 nt, alrededor de 323 nt, alrededor de 324 nt, alrededor de 325 nt,
alrededor de 326 nt, alrededor de 327 nt, alrededor de 328 nt, alrededor de 329 nt, alrededor de 330 nt,
alrededor de 331 nt, alrededor de 332 nt, alrededor de 333 nt, alrededor de 334 nt, alrededor de 335 nt,
alrededor de 336 nt, alrededor de 337 nt, alrededor de 338 nt, alrededor de 339 nt, alrededor de 340 nt,
30 alrededor de 341 nt, alrededor de 342 nt, alrededor de 343 nt, alrededor de 344 nt, alrededor de 345 nt,
alrededor de 346 nt, alrededor de 347 nt, alrededor de 348 nt, alrededor de 349 nt, alrededor de 350 nt,

alrededor de 351 nt, alrededor de 352 nt, alrededor de 353 nt, alrededor de 354 nt, alrededor de 355 nt,
alrededor de 356 nt, alrededor de 357 nt, alrededor de 358 nt, alrededor de 359 nt, alrededor de 360 nt,
alrededor de 361 nt, alrededor de 362 nt, alrededor de 363 nt, alrededor de 364 nt, alrededor de 365 nt,
alrededor de 366 nt, alrededor de 367 nt, alrededor de 368 nt, alrededor de 369 nt, alrededor de 370 nt,
5 alrededor de 371 nt, alrededor de 372 nt, alrededor de 373 nt, alrededor de 374 nt, alrededor de 375 nt,
alrededor de 376 nt, alrededor de 377 nt, alrededor de 378 nt, alrededor de 379 nt, alrededor de 380 nt,
alrededor de 381 nt, alrededor de 382 nt, alrededor de 383 nt, alrededor de 384 nt, alrededor de 385 nt,
alrededor de 386 nt, alrededor de 387 nt, alrededor de 388 nt, alrededor de 389 nt, alrededor de 390 nt,
alrededor de 391 nt, alrededor de 392 nt, alrededor de 393 nt, alrededor de 394 nt, alrededor de 395 nt,
10 alrededor de 396 nt, alrededor de 397 nt, alrededor de 398 nt, alrededor de 399 nt, alrededor de 400 nt,
alrededor de 401 nt, alrededor de 402 nt, alrededor de 403 nt, alrededor de 404 nt, alrededor de 405 nt,
alrededor de 406 nt, alrededor de 407 nt, alrededor de 408 nt, alrededor de 409 nt, alrededor de 410 nt,
alrededor de 411 nt, alrededor de 412 nt, alrededor de 413 nt, alrededor de 414 nt, alrededor de 415 nt,
alrededor de 416 nt, alrededor de 417 nt, alrededor de 418 nt, alrededor de 419 nt, alrededor de 420 nt,
15 alrededor de 421 nt, alrededor de 422 nt, alrededor de 423 nt, alrededor de 424 nt, alrededor de 425 nt,
alrededor de 426 nt, alrededor de 427 nt, alrededor de 428 nt, alrededor de 429 nt, alrededor de 430 nt,
alrededor de 431 nt, alrededor de 432 nt, alrededor de 433 nt, alrededor de 434 nt, alrededor de 435 nt,
alrededor de 436 nt, alrededor de 437 nt, alrededor de 438 nt, alrededor de 439 nt, alrededor de 440 nt,
alrededor de 441 nt, alrededor de 442 nt, alrededor de 443 nt, alrededor de 444 nt, alrededor de 445 nt,
20 alrededor de 446 nt, alrededor de 447 nt, alrededor de 448 nt, alrededor de 449 nt, alrededor de 450 nt,
alrededor de 451 nt, alrededor de 452 nt, alrededor de 453 nt, alrededor de 454 nt, alrededor de 455 nt,
alrededor de 456 nt, alrededor de 457 nt, alrededor de 458 nt, alrededor de 459 nt, alrededor de 460 nt,
alrededor de 461 nt, alrededor de 462 nt, alrededor de 463 nt, alrededor de 464 nt, alrededor de 465 nt,
alrededor de 466 nt, alrededor de 467 nt, alrededor de 468 nt, alrededor de 469 nt, alrededor de 470 nt,
25 alrededor de 471 nt, alrededor de 472 nt, alrededor de 473 nt, alrededor de 474 nt, alrededor de 475 nt,
alrededor de 476 nt, alrededor de 477 nt, alrededor de 478 nt, alrededor de 479 nt, alrededor de 480 nt,
alrededor de 481 nt, alrededor de 482 nt, alrededor de 483 nt, alrededor de 484 nt, alrededor de 485 nt,
alrededor de 486 nt, alrededor de 487 nt, alrededor de 488 nt, alrededor de 489 nt, alrededor de 490 nt,
alrededor de 491 nt, alrededor de 492 nt, alrededor de 493 nt, alrededor de 494 nt, alrededor de 495 nt,
30 alrededor de 496 nt, alrededor de 497 nt, alrededor de 498 nt, alrededor de 499 nt o 500 nt.

[0061] Algunas primeras secuencias nucleotídicas preferidas para usar en los promotores tienen una

secuencia nucleotídica que comprende desde alrededor de 150 nucleótidos hasta alrededor de 395 nucleótidos desde el extremo 3' de la SEQ ID NO: 1.

[0062] La primera secuencia nucleotídica puede comprender una secuencia de ácido nucleico que tenga al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 a lo largo de la primera secuencia nucleotídica. La primera secuencia nucleotídica puede tener una secuencia que tiene al menos alrededor del 70 %, al menos alrededor del 71 %, al menos alrededor del 72 %, al menos alrededor del 73 %, al menos alrededor del 74 %, al menos alrededor del 75 %, al menos alrededor del 76 %, al menos alrededor del 77 %, al menos alrededor del 78 %, al menos alrededor del 79 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 81 %, al menos alrededor del 82 %, al menos alrededor del 83 %, al menos alrededor del 84 %, al menos alrededor del 85 %, al menos alrededor del 86 %, al menos alrededor del 87 %, al menos alrededor del 88 %, al menos alrededor del 89 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 91 %, al menos alrededor del 92 %, al menos alrededor del 93 %, al menos alrededor del 94 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 %, al menos alrededor del 99 % o mayor identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 a lo largo de la longitud de la primera secuencia nucleotídica. Preferentemente, la primera secuencia nucleotídica puede tener al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 a lo largo de la primera secuencia nucleotídica.

[0063] La primera secuencia nucleotídica puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20 o más alteraciones de ácidos nucleicos, por ejemplo, sustituciones o deleciones, con respecto a una secuencia alineada de la misma longitud de la SEQ ID NO: 1.

[0064] Una primera secuencia nucleotídica ilustrativa puede comprender una secuencia de alrededor de 395 nt que tiene al menos un 70 % de identidad con el extremo 3' de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, la primera secuencia nucleotídica puede comprender la SEQ ID NO: 12. La primera secuencia nucleotídica puede comprender una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 12. Una primera secuencia nucleotídica ilustrativa puede comprender una secuencia de alrededor de 290 nt que tiene al menos un 70 % de identidad con el extremo 3' de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, la primera secuencia nucleotídica puede comprender la SEQ ID NO: 13. La primera secuencia nucleotídica puede comprender una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 13. Una primera secuencia nucleotídica ilustrativa puede comprender una secuencia de alrededor de

185 nt que tiene al menos un 70 % de identidad con el extremo 3' de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, la primera secuencia nucleotídica puede comprender la SEQ ID NO: 14. La primera secuencia nucleotídica puede comprender una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO:14. Una primera secuencia nucleotídica ilustrativa puede comprender una secuencia de alrededor de 150 nt que tiene al menos un 70 % de identidad con el extremo 3' de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, la primera secuencia nucleotídica puede comprender la SEQ ID NO: 15. La primera secuencia nucleotídica puede comprender una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO:15. En algunas modalidades, el promotor contiene una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15, y una segunda secuencia nucleotídica opcional como se describe en este documento. En algunas modalidades, el promotor contiene una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 70 % de identidad con cualquiera de las anteriores, y una segunda secuencia nucleotídica opcional como se describe en este documento.

b. Segunda secuencia nucleotídica

[0065] El promotor puede comprender una segunda secuencia nucleotídica que se deriva de un promotor específico del bastón y que, como molécula separada, tiene actividad promotora específica del bastón. Como se describe en este documento, cuando dichas segundas secuencias nucleotídicas se incluyen en los promotores híbridos de esta divulgación, el promotor híbrido resultante tiene actividad promotora específica del cono. Preferentemente, la segunda secuencia nucleotídica comprende al menos alrededor de 370 nucleótidos y tiene al menos un 70 % de identidad con una secuencia de igual longitud de la SEQ ID NO: 2. La segunda secuencia nucleotídica puede comprender al menos alrededor de 260 nucleótidos y tiene al menos un 70 % de identidad con una secuencia de igual longitud de la SEQ ID NO: 2. Un promotor que consiste en la SEQ ID NO: 2 puede denominarse en el presente documento ProA330.

[0066] Un componente promotor específico del bastón puede ser un truncamiento en 5', un truncamiento en 3', o ambos, de la SEQ ID NO: 2 y puede contener menos de 1000 nt de la SEQ ID NO: 2, debido a la delección de los nucleótidos en los extremos 5' y/o 3'. Por ejemplo, el componente promotor específico del bastón puede ser el mismo que los nucleótidos 106-1000 de la SEQ ID NO: 2 o puede ser el mismo que los nucleótidos 1-895 de la SEQ ID NO: 2. Preferentemente, el componente promotor específico del bastón puede comprender o consistir en los nucleótidos 631-895 de la SEQ ID NO: 2 (SEQ ID NO: 39, que puede denominarse min330), que se cree que es la porción mínima de la SEQ ID NO: 2 requerida para la actividad promotora específica del bastón.

[0067] Un componente promotor específico del bastón puede comprender cualquier cantidad de nucleótidos desde alrededor de 260 hasta alrededor de 369 nucleótidos de la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, el componente promotor específico del bastón puede comprender alrededor de 261 nt, 262 nt, 263 nt, 264 nt, 265 nt, 266 nt, 267 nt, 268 nt, 269 nt, 270 nt, 271 nt, 272 nt, 272 nt, 274 nt, 275 nt, 276 nt, 277 nt, 278 nt, 279 nt, 280 nt, 281 nt, 282 nt, 283 nt, 284 nt, 285 nt, 286 nt, 287 nt, 288 nt, 289 nt, 290 nt, 291 nt, 292 nt, 293 nt, 294 nt, 295 nt, 296 nt, 297 nt, 298 nt, 299 nt, 300 nt, 301 nt, 302 nt, 303 nt, 304 nt, 305 nt, 306 nt, 307 nt, 308 nt, 309 nt, 310 nt, 311 nt, 312 nt, 313 nt, 314 nt, 315 nt, 316 nt, 317 nt, 318 nt, 319 nt, 320 nt, 321 nt, 322 nt, 323 nt, 324 nt, 325 nt, 326 nt, 327 nt, 328 nt, 329 nt, 330 nt, 331 nt, 332 nt, 333 nt, 334 nt, 335 nt, 336 nt, 337 nt, 338 nt, 339 nt, 340 nt, 341 nt, 342 nt, 343 nt, 344 nt, 345 nt, 346 nt, 347 nt, 348 nt, 349 nt, 350 nt, 351 nt, 352 nt, 353 nt, 354 nt, 355 nt, 356 nt, 357 nt, 358 nt, 359 nt, 360 nt, 361 nt, 362 nt, 363 nt, 364 nt, 365 nt, 366 nt, 367 nt, 368 nt o alrededor de 369 nt de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos preferidos, el promotor específico del bastón comprende o consiste en la SEQ ID NO: 39 o una secuencia que tiene al menos alrededor de un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 39.

[0068] Por ejemplo, una segunda secuencia nucleotídica puede tener una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor del 70 %, al menos alrededor del 71 %, al menos alrededor del 72 %, al menos alrededor del 73 %, al menos alrededor del 74 %, al menos alrededor del 75 %, al menos alrededor del 76 %, al menos alrededor del 77 %, al menos alrededor del 78 %, al menos alrededor del 79 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 81 %, al menos alrededor del 82 %, al menos alrededor del 83 %, al menos alrededor del 84 %, al menos alrededor del 85 %, al menos alrededor del 86 %, al menos alrededor del 87 %, al menos alrededor del 88 %, al menos alrededor del 89 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 91 %, al menos alrededor del 92 %, al menos alrededor del 93 %, al menos alrededor del 94 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 %, al menos alrededor del 99 % o mayor identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 a lo largo de la longitud de la segunda secuencia nucleotídica. Preferentemente, la segunda secuencia nucleotídica puede tener al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 a lo largo de la longitud de la segunda secuencia nucleotídica. Estas modalidades incluyen, de modo no taxativo, modalidades en las que la primera secuencia nucleotídica tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia de igual longitud desde el extremo 3' de la SEQ ID NO: 1.

[0069] Las segundas secuencias nucleotídicas ilustrativas que se pueden utilizar en los promotores de esta divulgación incluyen la SEQ ID NO: 2 y una secuencia nucleotídica que tiene al menos alrededor de un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 a lo largo de la segunda secuencia nucleotídica.

[0070] La segunda secuencia nucleotídica puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20 o más alteraciones de ácidos nucleicos, por ejemplo, sustituciones o deleciones, con respecto a una secuencia alineada de la misma longitud de la SEQ ID NO: 2.

[0071] La segunda secuencia nucleotídica puede comprender una secuencia que tenga al menos un 70 % de identidad con una secuencia de igual longitud desde el extremo 3' de la SEQ ID NO: 2. Una segunda secuencia nucleotídica según este párrafo puede considerarse un truncamiento en 5' de la SEQ ID NO: 2, porque se han eliminado nucleótidos del extremo 5' de la SEQ ID NO: 2 para llegar a la segunda secuencia nucleotídica.

[0072] La segunda secuencia nucleotídica puede comprender una secuencia que tenga al menos un 70 % de identidad con una secuencia de igual longitud desde el extremo 5' de la SEQ ID NO: 2. Una segunda secuencia nucleotídica según este párrafo puede considerarse un truncamiento en 3' de la SEQ ID NO: 2, porque los nucleótidos del extremo 3' de la SEQ ID NO: 2 se han eliminado para llegar a la segunda secuencia nucleotídica.

[0073] Una segunda secuencia nucleotídica puede ser un truncamiento en 5', un truncamiento en 3', o ambos, de la SEQ ID NO: 2 y puede contener menos de 1000 nt de la SEQ ID NO: 2, debido a la deleción de nucleótidos en los extremos 5' y/o 3'. Por ejemplo, la segunda secuencia nucleotídica puede ser la misma que los nucleótidos 106-1000 de la SEQ ID NO:2 o puede ser la misma que los nucleótidos 1-895 de la SEQ ID NO:2.

[0074] Una segunda secuencia nucleotídica puede comprender cualquier cantidad de nucleótidos entre 370 y 1000. Por ejemplo, la segunda secuencia nucleotídica puede comprender alrededor de 370 nt, alrededor de 371 nt, alrededor de 372 nt, alrededor de 373 nt, alrededor de 374 nt, alrededor de 375 nt, alrededor de 376 nt, alrededor de 377 nt, alrededor de 378 nt, alrededor de 379 nt, alrededor de 380 nt, alrededor de 381 nt, alrededor de 382 nt, alrededor de 383 nt, alrededor de 384 nt, alrededor de 385 nt, alrededor de 386 nt, alrededor de 387 nt, alrededor de 388 nt, alrededor de 389 nt, alrededor de 390 nt, alrededor de 391 nt, alrededor de 392 nt, alrededor de 393 nt, alrededor de 394 nt, alrededor de 395 nt, alrededor de 396 nt, alrededor de 397 nt, alrededor de 398 nt, alrededor de 399 nt, alrededor de 400 nt, alrededor de 401 nt, alrededor de 402 nt, alrededor de 403 nt, alrededor de 404 nt, alrededor de 405 nt, alrededor de 406 nt, alrededor de 407 nt, alrededor de 408 nt, alrededor de 409 nt, alrededor de 410 nt,

alrededor de 411 nt, alrededor de 412 nt, alrededor de 413 nt, alrededor de 414 nt, alrededor de 415 nt,
alrededor de 416 nt, alrededor de 417 nt, alrededor de 418 nt, alrededor de 419 nt, alrededor de 420 nt,
alrededor de 421 nt, alrededor de 422 nt, alrededor de 423 nt, alrededor de 424 nt, alrededor de 425 nt,
alrededor de 426 nt, alrededor de 427 nt, alrededor de 428 nt, alrededor de 429 nt, alrededor de 430 nt,
5 alrededor de 431 nt, alrededor de 432 nt, alrededor de 433 nt, alrededor de 434 nt, alrededor de 435 nt,
alrededor de 436 nt, alrededor de 437 nt, alrededor de 438 nt, alrededor de 439 nt, alrededor de 440 nt,
alrededor de 441 nt, alrededor de 442 nt, alrededor de 443 nt, alrededor de 444 nt, alrededor de 445 nt,
alrededor de 446 nt, alrededor de 447 nt, alrededor de 448 nt, alrededor de 449 nt, alrededor de 450 nt,
alrededor de 451 nt, alrededor de 452 nt, alrededor de 453 nt, alrededor de 454 nt, alrededor de 455 nt,
10 alrededor de 456 nt, alrededor de 457 nt, alrededor de 458 nt, alrededor de 459 nt, alrededor de 460 nt,
alrededor de 461 nt, alrededor de 462 nt, alrededor de 463 nt, alrededor de 464 nt, alrededor de 465 nt,
alrededor de 466 nt, alrededor de 467 nt, alrededor de 468 nt, alrededor de 469 nt, alrededor de 470 nt,
alrededor de 471 nt, alrededor de 472 nt, alrededor de 473 nt, alrededor de 474 nt, alrededor de 475 nt,
alrededor de 476 nt, alrededor de 477 nt, alrededor de 478 nt, alrededor de 479 nt, alrededor de 480 nt,
15 alrededor de 481 nt, alrededor de 482 nt, alrededor de 483 nt, alrededor de 484 nt, alrededor de 485 nt,
alrededor de 486 nt, alrededor de 487 nt, alrededor de 488 nt, alrededor de 489 nt, alrededor de 490 nt,
alrededor de 491 nt, alrededor de 492 nt, alrededor de 493 nt, alrededor de 494 nt, alrededor de 495 nt,
alrededor de 496 nt, alrededor de 497 nt, alrededor de 498 nt, alrededor de 499 nt, alrededor de 500 nt,
alrededor de 501 nt, alrededor de 502 nt, alrededor de 503 nt, alrededor de 504 nt, alrededor de 505 nt,
20 alrededor de 506 nt, alrededor de 507 nt, alrededor de 508 nt, alrededor de 509 nt, alrededor de 510 nt,
alrededor de 511 nt, alrededor de 512 nt, alrededor de 513 nt, alrededor de 514 nt, alrededor de 515 nt,
alrededor de 516 nt, alrededor de 517 nt, alrededor de 518 nt, alrededor de 519 nt, alrededor de 520 nt,
alrededor de 521 nt, alrededor de 522 nt, alrededor de 523 nt, alrededor de 524 nt, alrededor de 525 nt,
alrededor de 526 nt, alrededor de 527 nt, alrededor de 528 nt, alrededor de 529 nt, alrededor de 530 nt,
25 alrededor de 531 nt, alrededor de 532 nt, alrededor de 533 nt, alrededor de 534 nt, alrededor de 535 nt,
alrededor de 536 nt, alrededor de 537 nt, alrededor de 538 nt, alrededor de 539 nt, alrededor de 540 nt,
alrededor de 541 nt, alrededor de 542 nt, alrededor de 543 nt, alrededor de 544 nt, alrededor de 545 nt,
alrededor de 546 nt, alrededor de 547 nt, alrededor de 548 nt, alrededor de 549 nt, alrededor de 550 nt,
alrededor de 551 nt, alrededor de 552 nt, alrededor de 553 nt, alrededor de 554 nt, alrededor de 555 nt,
30 alrededor de 556 nt, alrededor de 557 nt, alrededor de 558 nt, alrededor de 559 nt, alrededor de 560 nt,
alrededor de 561 nt, alrededor de 562 nt, alrededor de 563 nt, alrededor de 564 nt, alrededor de 565 nt,

alrededor de 566 nt, alrededor de 567 nt, alrededor de 568 nt, alrededor de 569 nt, alrededor de 570 nt,
alrededor de 571 nt, alrededor de 572 nt, alrededor de 573 nt, alrededor de 574 nt, alrededor de 575 nt,
alrededor de 576 nt, alrededor de 577 nt, alrededor de 578 nt, alrededor de 579 nt, alrededor de 580 nt,
alrededor de 581 nt, alrededor de 582 nt, alrededor de 583 nt, alrededor de 584 nt, alrededor de 585 nt,
5 alrededor de 586 nt, alrededor de 587 nt, alrededor de 588 nt, alrededor de 589 nt, alrededor de 590 nt,
alrededor de 591 nt, alrededor de 592 nt, alrededor de 593 nt, alrededor de 594 nt, alrededor de 595 nt,
alrededor de 596 nt, alrededor de 597 nt, alrededor de 598 nt, alrededor de 599 nt, alrededor de 600 nt,
alrededor de 601 nt, alrededor de 602 nt, alrededor de 603 nt, alrededor de 604 nt, alrededor de 605 nt,
alrededor de 606 nt, alrededor de 607 nt, alrededor de 608 nt, alrededor de 609 nt, alrededor de 610 nt,
10 alrededor de 611 nt, alrededor de 612 nt, alrededor de 613 nt, alrededor de 614 nt, alrededor de 615 nt,
alrededor de 616 nt, alrededor de 617 nt, alrededor de 618 nt, alrededor de 619 nt, alrededor de 620 nt,
alrededor de 621 nt, alrededor de 622 nt, alrededor de 623 nt, alrededor de 624 nt, alrededor de 625 nt,
alrededor de 626 nt, alrededor de 627 nt, alrededor de 628 nt, alrededor de 629 nt, alrededor de 630 nt,
alrededor de 631 nt, alrededor de 632 nt, alrededor de 633 nt, alrededor de 634 nt, alrededor de 635 nt,
15 alrededor de 636 nt, alrededor de 637 nt, alrededor de 638 nt, alrededor de 639 nt, alrededor de 640 nt,
alrededor de 641 nt, alrededor de 642 nt, alrededor de 643 nt, alrededor de 644 nt, alrededor de 645 nt,
alrededor de 646 nt, alrededor de 647 nt, alrededor de 648 nt, alrededor de 649 nt, alrededor de 650 nt,
alrededor de 651 nt, alrededor de 652 nt, alrededor de 653 nt, alrededor de 654 nt, alrededor de 655 nt,
alrededor de 656 nt, alrededor de 657 nt, alrededor de 658 nt, alrededor de 659 nt, alrededor de 660 nt,
20 alrededor de 661 nt, alrededor de 662 nt, alrededor de 663 nt, alrededor de 664 nt, alrededor de 665 nt,
alrededor de 666 nt, alrededor de 667 nt, alrededor de 668 nt, alrededor de 669 nt, alrededor de 670 nt,
alrededor de 671 nt, alrededor de 672 nt, alrededor de 673 nt, alrededor de 674 nt, alrededor de 675 nt,
alrededor de 676 nt, alrededor de 677 nt, alrededor de 678 nt, alrededor de 679 nt, alrededor de 680 nt,
alrededor de 681 nt, alrededor de 682 nt, alrededor de 683 nt, alrededor de 684 nt, alrededor de 685 nt,
25 alrededor de 686 nt, alrededor de 687 nt, alrededor de 688 nt, alrededor de 689 nt, alrededor de 690 nt,
alrededor de 691 nt, alrededor de 692 nt, alrededor de 693 nt, alrededor de 694 nt, alrededor de 695 nt,
alrededor de 696 nt, alrededor de 697 nt, alrededor de 698 nt, alrededor de 699 nt, alrededor de 700 nt,
alrededor de 701 nt, alrededor de 702 nt, alrededor de 703 nt, alrededor de 704 nt, alrededor de 705 nt,
alrededor de 706 nt, alrededor de 707 nt, alrededor de 708 nt, alrededor de 709 nt, alrededor de 710 nt,
30 alrededor de 711 nt, alrededor de 712 nt, alrededor de 713 nt, alrededor de 714 nt, alrededor de 715 nt,
alrededor de 716 nt, alrededor de 717 nt, alrededor de 718 nt, alrededor de 719 nt, alrededor de 720 nt,

alrededor de 721 nt, alrededor de 722 nt, alrededor de 723 nt, alrededor de 724 nt, alrededor de 725 nt,
alrededor de 726 nt, alrededor de 727 nt, alrededor de 728 nt, alrededor de 729 nt, alrededor de 730 nt,
alrededor de 731 nt, alrededor de 732 nt, alrededor de 733 nt, alrededor de 734 nt, alrededor de 735 nt,
alrededor de 736 nt, alrededor de 737 nt, alrededor de 738 nt, alrededor de 739 nt, alrededor de 740 nt,
5 alrededor de 741 nt, alrededor de 742 nt, alrededor de 743 nt, alrededor de 744 nt, alrededor de 745 nt,
alrededor de 746 nt, alrededor de 747 nt, alrededor de 748 nt, alrededor de 749 nt, alrededor de 750 nt,
alrededor de 751 nt, alrededor de 752 nt, alrededor de 753 nt, alrededor de 754 nt, alrededor de 755 nt,
alrededor de 756 nt, alrededor de 757 nt, alrededor de 758 nt, alrededor de 759 nt, alrededor de 760 nt,
alrededor de 761 nt, alrededor de 762 nt, alrededor de 763 nt, alrededor de 764 nt, alrededor de 765 nt,
10 alrededor de 766 nt, alrededor de 767 nt, alrededor de 768 nt, alrededor de 769 nt, alrededor de 770 nt,
alrededor de 771 nt, alrededor de 772 nt, alrededor de 773 nt, alrededor de 774 nt, alrededor de 775 nt,
alrededor de 776 nt, alrededor de 777 nt, alrededor de 778 nt, alrededor de 779 nt, alrededor de 780 nt,
alrededor de 781 nt, alrededor de 782 nt, alrededor de 783 nt, alrededor de 784 nt, alrededor de 785 nt,
alrededor de 786 nt, alrededor de 787 nt, alrededor de 788 nt, alrededor de 789 nt, alrededor de 790 nt,
15 alrededor de 791 nt, alrededor de 792 nt, alrededor de 793 nt, alrededor de 794 nt, alrededor de 795 nt,
alrededor de 796 nt, alrededor de 797 nt, alrededor de 798 nt, alrededor de 799 nt, alrededor de 800 nt,
alrededor de 801 nt, alrededor de 802 nt, alrededor de 803 nt, alrededor de 804 nt, alrededor de 805 nt,
alrededor de 806 nt, alrededor de 807 nt, alrededor de 808 nt, alrededor de 809 nt, alrededor de 810 nt,
alrededor de 811 nt, alrededor de 812 nt, alrededor de 813 nt, alrededor de 814 nt, alrededor de 815 nt,
20 alrededor de 816 nt, alrededor de 817 nt, alrededor de 818 nt, alrededor de 819 nt, alrededor de 820 nt,
alrededor de 821 nt, alrededor de 822 nt, alrededor de 823 nt, alrededor de 824 nt, alrededor de 825 nt,
alrededor de 826 nt, alrededor de 827 nt, alrededor de 828 nt, alrededor de 829 nt, alrededor de 830 nt,
alrededor de 831 nt, alrededor de 832 nt, alrededor de 833 nt, alrededor de 834 nt, alrededor de 835 nt,
alrededor de 836 nt, alrededor de 837 nt, alrededor de 838 nt, alrededor de 839 nt, alrededor de 840 nt,
25 alrededor de 841 nt, alrededor de 842 nt, alrededor de 843 nt, alrededor de 844 nt, alrededor de 845 nt,
alrededor de 846 nt, alrededor de 847 nt, alrededor de 848 nt, alrededor de 849 nt, alrededor de 850 nt,
alrededor de 851 nt, alrededor de 852 nt, alrededor de 853 nt, alrededor de 854 nt, alrededor de 855 nt,
alrededor de 856 nt, alrededor de 857 nt, alrededor de 858 nt, alrededor de 859 nt, alrededor de 860 nt,
alrededor de 861 nt, alrededor de 862 nt, alrededor de 863 nt, alrededor de 864 nt, alrededor de 865 nt,
30 alrededor de 866 nt, alrededor de 867 nt, alrededor de 868 nt, alrededor de 869 nt, alrededor de 870 nt,
alrededor de 871 nt, alrededor de 872 nt, alrededor de 873 nt, alrededor de 874 nt, alrededor de 875 nt,

alrededor de 876 nt, alrededor de 877 nt, alrededor de 878 nt, alrededor de 879 nt, alrededor de 880 nt, alrededor de 881 nt, alrededor de 882 nt, alrededor de 883 nt, alrededor de 884 nt, alrededor de 885 nt, alrededor de 886 nt, alrededor de 887 nt, alrededor de 888 nt, alrededor de 889 nt, alrededor de 890 nt, alrededor de 891 nt, alrededor de 892 nt, alrededor de 893 nt, alrededor de 894 nt, alrededor de 895 nt, alrededor de 896 nt, alrededor de 897 nt, alrededor de 898 nt, alrededor de 899 nt, alrededor de 900 nt, alrededor de 901 nt, alrededor de 902 nt, alrededor de 903 nt, alrededor de 904 nt, alrededor de 905 nt, alrededor de 906 nt, alrededor de 907 nt, alrededor de 908 nt, alrededor de 909 nt, alrededor de 910 nt, alrededor de 911 nt, alrededor de 912 nt, alrededor de 913 nt, alrededor de 914 nt, alrededor de 915 nt, alrededor de 916 nt, alrededor de 917 nt, alrededor de 918 nt, alrededor de 919 nt, alrededor de 920 nt, alrededor de 921 nt, alrededor de 922 nt, alrededor de 923 nt, alrededor de 924 nt, alrededor de 925 nt, alrededor de 926 nt, alrededor de 927 nt, alrededor de 928 nt, alrededor de 929 nt, alrededor de 930 nt, alrededor de 931 nt, alrededor de 932 nt, alrededor de 933 nt, alrededor de 934 nt, alrededor de 935 nt, alrededor de 936 nt, alrededor de 937 nt, alrededor de 938 nt, alrededor de 939 nt, alrededor de 940 nt, alrededor de 941 nt, alrededor de 942 nt, alrededor de 943 nt, alrededor de 944 nt, alrededor de 945 nt, alrededor de 946 nt, alrededor de 947 nt, alrededor de 948 nt, alrededor de 949 nt, alrededor de 950 nt, alrededor de 951 nt, alrededor de 952 nt, alrededor de 953 nt, alrededor de 954 nt, alrededor de 955 nt, alrededor de 956 nt, alrededor de 957 nt, alrededor de 958 nt, alrededor de 959 nt, alrededor de 960 nt, alrededor de 961 nt, alrededor de 962 nt, alrededor de 963 nt, alrededor de 964 nt, alrededor de 965 nt, alrededor de 966 nt, alrededor de 967 nt, alrededor de 968 nt, alrededor de 969 nt, alrededor de 970 nt, alrededor de 971 nt, alrededor de 972 nt, alrededor de 973 nt, alrededor de 974 nt, alrededor de 975 nt, alrededor de 976 nt, alrededor de 977 nt, alrededor de 978 nt, alrededor de 979 nt, alrededor de 980 nt, alrededor de 981 nt, alrededor de 982 nt, alrededor de 983 nt, alrededor de 984 nt, alrededor de 985 nt, alrededor de 986 nt, alrededor de 987 nt, alrededor de 988 nt, alrededor de 989 nt, alrededor de 990 nt, alrededor de 991 nt, alrededor de 992 nt, alrededor de 993 nt, alrededor de 994 nt, alrededor de 995 nt, alrededor de 996 nt, alrededor de 997 nt, alrededor de 998 nt, alrededor de 999 nt o alrededor de 1000 nt.

[0075] Algunas segundas secuencias nucleotídicas preferidas para su uso en los promotores de esta divulgación tienen una secuencia nucleotídica que comprende de alrededor de 370 nucleótidos a alrededor de 1000 nucleótidos desde el extremo 3' de la SEQ ID NO: 2. Algunas segundas secuencias nucleotídicas preferidas para su uso en los promotores de esta divulgación tienen una secuencia nucleotídica que comprende de alrededor de 895 nucleótidos a alrededor de 1000 nucleótidos desde el extremo 5' de la SEQ ID NO: 2. Los segundos nucleótidos particularmente preferidos comprenden la SEQ ID NO: 39 o

una secuencia que tiene al menos alrededor de un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 39.

[0076] La segunda secuencia nucleotídica puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 a lo largo de la longitud de la segunda secuencia nucleotídica. La segunda secuencia nucleotídica puede tener una secuencia que tiene al menos
5 alrededor del 70 %, al menos alrededor del 71 %, al menos alrededor del 72 %, al menos alrededor del 73 %, al menos alrededor del 74 %, al menos alrededor del 75 %, al menos alrededor del 76 %, al menos alrededor del 77 %, al menos alrededor del 78 %, al menos alrededor del 79 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 81 %, al menos alrededor del 82 %, al menos alrededor del 83 %, al menos alrededor del 84 %, al menos alrededor del 85 %, al menos alrededor del 86 %, al menos alrededor del
10 87 %, al menos alrededor del 88 %, al menos alrededor del 89 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 91 %, al menos alrededor del 92 %, al menos alrededor del 93 %, al menos alrededor del 94 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 %, al menos alrededor del 99 % o mayor identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 a lo largo de la longitud de la segunda secuencia nucleotídica. Preferentemente, la segunda secuencia
15 nucleotídica puede tener al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 a lo largo de la longitud de la segunda secuencia nucleotídica.

[0077] La segunda secuencia nucleotídica puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de
20 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20 o más alteraciones de ácidos nucleicos, por ejemplo, sustituciones o deleciones, con respecto a una secuencia alineada de la misma longitud de la SEQ ID NO: 2.

[0078] Una segunda secuencia nucleotídica ilustrativa puede comprender una secuencia de alrededor de 895 nt que tiene al menos un 70 % de identidad con el extremo 3' de la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, la
25 segunda secuencia nucleotídica puede comprender la SEQ ID NO: 21. Una segunda secuencia nucleotídica ilustrativa puede comprender una secuencia de alrededor de 790 nt que tiene al menos un 70 % de identidad con el extremo 3' de la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, la segunda secuencia nucleotídica puede comprender la SEQ ID NO: 22. Una segunda secuencia nucleotídica ilustrativa puede comprender una secuencia de alrededor de 685 nt que tiene al menos un 70 % de identidad con el extremo 3' de la SEQ ID
30 NO: 2. Por ejemplo, la segunda secuencia nucleotídica puede comprender la SEQ ID NO: 23. Una segunda secuencia nucleotídica ilustrativa puede comprender una secuencia de alrededor de 580 nt que tiene al

menos un 70 % de identidad con el extremo 3' de la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, la segunda secuencia nucleotídica puede comprender la SEQ ID NO: 24. Una segunda secuencia nucleotídica ilustrativa puede comprender una secuencia de alrededor de 475 nt que tiene al menos un 70 % de identidad con el extremo 3' de la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, la segunda secuencia nucleotídica puede comprender la SEQ ID NO: 25. Una segunda secuencia nucleotídica ilustrativa puede comprender una secuencia de alrededor de 390 nt que tiene al menos un 70 % de identidad con el extremo 3' de la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, la segunda secuencia nucleotídica puede comprender la SEQ ID NO: 26. Una segunda secuencia nucleotídica ilustrativa puede comprender una secuencia de alrededor de 895 nt que tiene al menos un 70 % de identidad con el extremo 5' de la SEQ ID NO: 2. Por ejemplo, la segunda secuencia nucleotídica puede comprender la SEQ ID NO: 30.

[0079] En algunas modalidades, la segunda secuencia nucleotídica comprende la SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 30. En algunas modalidades, la segunda secuencia nucleotídica comprende una secuencia que tiene al menos 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 30. En modalidades preferidas, la segunda secuencia nucleotídica comprende la SEQ ID NO: 39 o una secuencia que tiene al menos alrededor de un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 39.

c. Estructura y orientación del promotor híbrido

[0080] Como se describe y ejemplifica en este documento, un promotor híbrido que comprende una primera secuencia nucleotídica que se deriva de un promotor específico del cono (SEQ ID NO: 1) y una segunda secuencia nucleotídica que se deriva de un promotor específico del bastón (SEQ ID NO: 2) tiene dos propiedades inesperadas: es específico del cono y tiene una actividad promotora aumentada en comparación con la SEQ ID NO: 1 de longitud completa sola.

[0081] El promotor híbrido comprende una primera secuencia nucleotídica y una segunda secuencia nucleotídica, ambas como se describe en este documento. Si se desea, el promotor puede comprender además una o más secuencias promotoras específicas del bastón o del cono. En algunas modalidades, el promotor puede comprender además uno o más promotores específicos del cono o secuencias nucleotídicas derivadas de un promotor específico del cono, como hG1.7 (SEQ ID NO: 20) o PR1.7 (SEQ ID NO: 19).

[0082] La primera secuencia nucleotídica, la segunda secuencia nucleotídica y cualquier otra secuencia

promotora específica del bastón o del cono (si está incluida) pueden incluirse cada una en el promotor como una sola copia o como múltiples copias. Por ejemplo, cada primera secuencia nucleotídica y cada segunda secuencia nucleotídica pueden estar presentes en una a alrededor de 10 copias (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 copias). En algunas modalidades, el promotor puede comprender dos o más primeras secuencias nucleotídicas, dos o más segundas secuencias nucleotídicas o ambas. Cuando se incluyen dos o más primeras secuencias nucleotídicas en el promotor, no es necesario que las dos primeras secuencias nucleotídicas sean idénticas, siempre que cada una de ellas cumpla individualmente los criterios establecidos en este documento con respecto a las primeras secuencias nucleotídicas. De manera similar, cuando se incluyen dos o más segundas secuencias nucleotídicas en el promotor, no es necesario que las dos segundas secuencias nucleotídicas sean idénticas, siempre que cada una de ellas cumpla individualmente los criterios establecidos en este documento con respecto a las segundas secuencias nucleotídicas.

[0083] En los promotores híbridos de esta divulgación, la(s) primera(s) secuencia(s) nucleotídica(s) y la(s) segunda(s) secuencia(s) nucleotídica(s) se pueden colocar en cualquier orden deseado, y con o sin otras secuencias entre ellas. Como se ejemplifica en este documento, los promotores híbridos que incluyen la misma primera secuencia nucleotídica y la misma segunda secuencia nucleotídica, pero en diferentes órdenes, son eficaces para impulsar la expresión de genes indicadores en los fotorreceptores del cono humanos.

[0084] El promotor puede comprender de 5' a 3' la primera secuencia nucleotídica unida a la segunda secuencia nucleotídica sin secuencias entre ellas. El promotor puede comprender de 5' a 3' la segunda secuencia nucleotídica unida a la primera secuencia nucleotídica sin secuencias entre ellas. En otros ejemplos, el promotor puede comprender dos primeras secuencias nucleotídicas (primera secuencia A y primera secuencia B) y una segunda secuencia nucleotídica, dispuestas como primera secuencia A-segunda secuencia nucleotídica-primera secuencia B de 5' a 3'.

[0085] En algunas modalidades, el promotor puede comprender una o más unidades promotoras, en donde cada unidad promotora comprende una primera secuencia nucleotídica y una segunda secuencia nucleotídica en cualquier orden, y cada unidad promotora como una molécula separada tiene actividad promotora específica del cono. Por ejemplo, el promotor puede comprender de 1 a alrededor de 4 unidades promotoras. En otro ejemplo, el promotor puede comprender de 4 a 10 unidades promotoras. El promotor puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades promotoras que pueden ser iguales o diferentes.

[0086] Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una primera secuencia nucleotídica

que comprende la SEQ ID NO: 1 y una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 2. Un promotor particular de este tipo, denominado Pro572, tiene la SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, la primera secuencia nucleotídica comprende una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 3. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 2 y una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 1. Un promotor particular de este tipo, denominado Pro573, tiene la SEQ ID NO: 5. En algunas modalidades, la primera secuencia nucleotídica comprende una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 5. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 12 y una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 2. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 2 y una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 12. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 13 y una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 2. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 2 y una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 13. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 14 y una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 2. Un promotor particular de este tipo, denominado Pro572.2, tiene la SEQ ID NO: 4. En algunas modalidades, la secuencia nucleotídica para un promotor comprende una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 4.

[0087] En algunas modalidades, un promotor puede incluir, de 5' a 3', una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 2 y una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 14. Un promotor particular de este tipo, denominado Pro573.2, tiene la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, la secuencia nucleotídica para un promotor comprende una secuencia que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 6. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 15 y una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 2. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 2 y una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 15. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 1 una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 21. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una segunda

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 24 y una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 15. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 15 y una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 25. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 25 y una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 15. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 15 y una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 26. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 26 y una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 15. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 15 y una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 30. Algunos promotores particulares pueden incluir, de 5' a 3', una segunda secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 30 y una primera secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 15. En ciertas modalidades preferidas, el promotor híbrido contiene alrededor de 700 nucleótidos o menos, alrededor de 600 nucleótidos o menos, o más preferentemente, alrededor de 500 nucleótidos o menos.

d. Promotores específicos del cono que son truncamientos de la SEQ ID NO: 1

[0088] En otros aspectos, los promotores sintéticos específicos del cono divulgados en el presente documento comprenden un fragmento activo del promotor específico del cono de la SEQ ID NO: 1, con la condición de que el promotor sintético de este aspecto no sea la SEQ ID NO: 1. Los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento pueden comprender un promotor que comprende un promotor específico del cono de al menos alrededor de 150 nucleótidos y no más de 499 nucleótidos que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 a lo largo de la longitud del promotor específico del cono. Dichos promotores pueden carecer de una segunda secuencia nucleotídica, como se describe en este documento.

[0089] Como se describe y ejemplifica en este documento, los truncamientos de la SEQ ID NO: 1 tienen actividad promotora específica del cono y pueden impulsar la expresión en conos humanos, por ejemplo, conos que están inactivos y ya no responden a la luz. Además, dichos promotores pueden generar una mayor expresión en los conos que la SEQ ID NO: 1 de longitud completa sola. Tales promotores pueden tener actividad promotora en conos humanos, por ejemplo, conos de la retina in vivo, en explantes de retina u organoides de la retina. En algunos casos, el promotor específico del cono no tiene actividad

promotora en otras células de la retina humana, como los bastones.

[0090] El promotor específico del cono puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con una secuencia de igual longitud (es decir, al menos alrededor de 150 nt y no más de 499 nt) de la SEQ ID NO: 1. La primera secuencia puede tener una
5 secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos alrededor del 70 %, al menos alrededor del 71 %, al menos alrededor del 72 %, al menos alrededor del 73 %, al menos alrededor del 74 %, al menos alrededor del 75 %, al menos alrededor del 76 %, al menos alrededor del 77 %, al menos alrededor del 78 %, al menos alrededor del 79 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 81 %, al menos alrededor del 82 %, al menos alrededor del 83 %, al menos alrededor del 84 %, al menos alrededor del 85 %, al
10 menos alrededor del 86 %, al menos alrededor del 87 %, al menos alrededor del 88 %, al menos alrededor del 89 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 91 %, al menos alrededor del 92 %, al menos alrededor del 93 %, al menos alrededor del 94 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 %, al menos alrededor del 99 % o mayor identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 a lo largo de la longitud de la primera secuencia nucleotídica.

[0091] El promotor específico del cono puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20 o más alteraciones de ácidos nucleicos, por ejemplo, sustituciones o deleciones, en comparación con la porción correspondiente de la SEQ ID
20 NO: 1.

[0092] El promotor específico del cono puede comprender al menos 150 nucleótidos, que tienen al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, preferentemente el extremo 3' de la SEQ ID NO:1. Como se muestra en este documento, dichos fragmentos de la SEQ ID NO:1 conservan actividad promotora específica del cono.

[0093] El promotor específico del cono puede comprender al menos 150 nucleótidos, que tienen al menos un 70 % de identidad con una secuencia de igual longitud desde el extremo 3' de la SEQ ID NO: 1. Un promotor específico del cono según este párrafo puede considerarse un truncamiento en 5' de la SEQ ID NO: 1, porque se han eliminado nucleótidos del extremo 5' de la SEQ ID NO: 1 para llegar a la primera secuencia.

[0094] El promotor específico del cono puede ser un truncamiento en 5' de la SEQ ID NO: 1 y contener al menos 150 nt pero menos de los 500 nt de ProA7, debido a la deleción de nucleótidos en el extremo 5'.

Por ejemplo, el promotor específico del cono puede ser los nucleótidos 386-500 de la SEQ ID NO:1 o los nucleótidos 2-500 de la SEQ ID NO:1.

[0095] Por ejemplo, el promotor específico del cono puede comprender alrededor de 150 nucleótidos (nt), alrededor de 151 nt, alrededor de 152 nt, alrededor de 153 nt, alrededor de 154 nt, alrededor de 155 nt, alrededor de 156 nt, alrededor de 157 nt, alrededor de 158 nt, alrededor de 159 nt, alrededor de 160 nt, alrededor de 161 nt, alrededor de 162 nt, alrededor de 163 nt, alrededor de 164 nt, alrededor de 165 nt, alrededor de 166 nt, alrededor de 167 nt, alrededor de 168 nt, alrededor de 169 nt, alrededor de 170 nt, alrededor de 171 nt, alrededor de 172 nt, alrededor de 173 nt, alrededor de 174 nt, alrededor de 175 nt, alrededor de 176 nt, alrededor de 177 nt, alrededor de 178 nt, alrededor de 179 nt, alrededor de 180 nt, alrededor de 181 nt, alrededor de 182 nt, alrededor de 183 nt, alrededor de 184 nt, alrededor de 185 nt, alrededor de 186 nt, alrededor de 187 nt, alrededor de 188 nt, alrededor de 189 nt, alrededor de 190 nt, alrededor de 191 nt, alrededor de 192 nt, alrededor de 193 nt, alrededor de 194 nt, alrededor de 195 nt, alrededor de 196 nt, alrededor de 197 nt, alrededor de 198 nt, alrededor de 199 nt, alrededor de 200 nt, alrededor de 201 nt, alrededor de 202 nt, alrededor de 203 nt, alrededor de 204 nt, alrededor de 205 nt, alrededor de 206 nt, alrededor de 207 nt, alrededor de 208 nt, alrededor de 209 nt, alrededor de 210 nt, alrededor de 211 nt, alrededor de 212 nt, alrededor de 213 nt, alrededor de 214 nt, alrededor de 215 nt, alrededor de 216 nt, alrededor de 217 nt, alrededor de 218 nt, alrededor de 219 nt, alrededor de 220 nt, alrededor de 221 nt, alrededor de 222 nt, alrededor de 223 nt, alrededor de 224 nt, alrededor de 225 nt, alrededor de 226 nt, alrededor de 227 nt, alrededor de 228 nt, alrededor de 229 nt, alrededor de 230 nt, alrededor de 231 nt, alrededor de 232 nt, alrededor de 233 nt, alrededor de 234 nt, alrededor de 235 nt, alrededor de 236 nt, alrededor de 237 nt, alrededor de 238 nt, alrededor de 239 nt, alrededor de 240 nt, alrededor de 241 nt, alrededor de 242 nt, alrededor de 243 nt, alrededor de 244 nt, alrededor de 245 nt, alrededor de 246 nt, alrededor de 247 nt, alrededor de 248 nt, alrededor de 249 nt, alrededor de 250 nt, alrededor de 251 nt, alrededor de 252 nt, alrededor de 253 nt, alrededor de 254 nt, alrededor de 255 nt, alrededor de 256 nt, alrededor de 257 nt, alrededor de 258 nt, alrededor de 259 nt, alrededor de 260 nt, alrededor de 261 nt, alrededor de 262 nt, alrededor de 263 nt, alrededor de 264 nt, alrededor de 265 nt, alrededor de 266 nt, alrededor de 267 nt, alrededor de 268 nt, alrededor de 269 nt, alrededor de 270 nt, alrededor de 271 nt, alrededor de 272 nt, alrededor de 273 nt, alrededor de 274 nt, alrededor de 275 nt, alrededor de 276 nt, alrededor de 277 nt, alrededor de 278 nt, alrededor de 279 nt, alrededor de 280 nt, alrededor de 281 nt, alrededor de 282 nt, alrededor de 283 nt, alrededor de 284 nt, alrededor de 285 nt, alrededor de 286 nt, alrededor de 287 nt, alrededor de 288 nt, alrededor de 289 nt, alrededor de 290 nt,

alrededor de 291 nt, alrededor de 292 nt, alrededor de 293 nt, alrededor de 294 nt, alrededor de 295 nt,
alrededor de 296 nt, alrededor de 297 nt, alrededor de 298 nt, alrededor de 299 nt, alrededor de 300 nt,
alrededor de 301 nt, alrededor de 302 nt, alrededor de 303 nt, alrededor de 304 nt, alrededor de 305 nt,
alrededor de 306 nt, alrededor de 307 nt, alrededor de 308 nt, alrededor de 309 nt, alrededor de 310 nt,
5 alrededor de 311 nt, alrededor de 312 nt, alrededor de 313 nt, alrededor de 314 nt, alrededor de 315 nt,
alrededor de 316 nt, alrededor de 317 nt, alrededor de 318 nt, alrededor de 319 nt, alrededor de 320 nt,
alrededor de 321 nt, alrededor de 322 nt, alrededor de 323 nt, alrededor de 324 nt, alrededor de 325 nt,
alrededor de 326 nt, alrededor de 327 nt, alrededor de 328 nt, alrededor de 329 nt, alrededor de 330 nt,
alrededor de 331 nt, alrededor de 332 nt, alrededor de 333 nt, alrededor de 334 nt, alrededor de 335 nt,
10 alrededor de 336 nt, alrededor de 337 nt, alrededor de 338 nt, alrededor de 339 nt, alrededor de 340 nt,
alrededor de 341 nt, alrededor de 342 nt, alrededor de 343 nt, alrededor de 344 nt, alrededor de 345 nt,
alrededor de 346 nt, alrededor de 347 nt, alrededor de 348 nt, alrededor de 349 nt, alrededor de 350 nt,
alrededor de 351 nt, alrededor de 352 nt, alrededor de 353 nt, alrededor de 354 nt, alrededor de 355 nt,
alrededor de 356 nt, alrededor de 357 nt, alrededor de 358 nt, alrededor de 359 nt, alrededor de 360 nt,
15 alrededor de 361 nt, alrededor de 362 nt, alrededor de 363 nt, alrededor de 364 nt, alrededor de 365 nt,
alrededor de 366 nt, alrededor de 367 nt, alrededor de 368 nt, alrededor de 369 nt, alrededor de 370 nt,
alrededor de 371 nt, alrededor de 372 nt, alrededor de 373 nt, alrededor de 374 nt, alrededor de 375 nt,
alrededor de 376 nt, alrededor de 377 nt, alrededor de 378 nt, alrededor de 379 nt, alrededor de 380 nt,
alrededor de 381 nt, alrededor de 382 nt, alrededor de 383 nt, alrededor de 384 nt, alrededor de 385 nt,
20 alrededor de 386 nt, alrededor de 387 nt, alrededor de 388 nt, alrededor de 389 nt, alrededor de 390 nt,
alrededor de 391 nt, alrededor de 392 nt, alrededor de 393 nt, alrededor de 394 nt, alrededor de 395 nt,
alrededor de 396 nt, alrededor de 397 nt, alrededor de 398 nt, alrededor de 399 nt, alrededor de 400 nt,
alrededor de 401 nt, alrededor de 402 nt, alrededor de 403 nt, alrededor de 404 nt, alrededor de 405 nt,
alrededor de 406 nt, alrededor de 407 nt, alrededor de 408 nt, alrededor de 409 nt, alrededor de 410 nt,
25 alrededor de 411 nt, alrededor de 412 nt, alrededor de 413 nt, alrededor de 414 nt, alrededor de 415 nt,
alrededor de 416 nt, alrededor de 417 nt, alrededor de 418 nt, alrededor de 419 nt, alrededor de 420 nt,
alrededor de 421 nt, alrededor de 422 nt, alrededor de 423 nt, alrededor de 424 nt, alrededor de 425 nt,
alrededor de 426 nt, alrededor de 427 nt, alrededor de 428 nt, alrededor de 429 nt, alrededor de 430 nt,
alrededor de 431 nt, alrededor de 432 nt, alrededor de 433 nt, alrededor de 434 nt, alrededor de 435 nt,
30 alrededor de 436 nt, alrededor de 437 nt, alrededor de 438 nt, alrededor de 439 nt, alrededor de 440 nt,
alrededor de 441 nt, alrededor de 442 nt, alrededor de 443 nt, alrededor de 444 nt, alrededor de 445 nt,

alrededor de 446 nt, alrededor de 447 nt, alrededor de 448 nt, alrededor de 449 nt, alrededor de 450 nt, alrededor de 451 nt, alrededor de 452 nt, alrededor de 453 nt, alrededor de 454 nt, alrededor de 455 nt, alrededor de 456 nt, alrededor de 457 nt, alrededor de 458 nt, alrededor de 459 nt, alrededor de 460 nt, alrededor de 461 nt, alrededor de 462 nt, alrededor de 463 nt, alrededor de 464 nt, alrededor de 465 nt, alrededor de 466 nt, alrededor de 467 nt, alrededor de 468 nt, alrededor de 469 nt, alrededor de 470 nt, alrededor de 471 nt, alrededor de 472 nt, alrededor de 473 nt, alrededor de 474 nt, alrededor de 475 nt, alrededor de 476 nt, alrededor de 477 nt, alrededor de 478 nt, alrededor de 479 nt, alrededor de 480 nt, alrededor de 481 nt, alrededor de 482 nt, alrededor de 483 nt, alrededor de 484 nt, alrededor de 485 nt, alrededor de 486 nt, alrededor de 487 nt, alrededor de 488 nt, alrededor de 489 nt, alrededor de 490 nt, alrededor de 491 nt, alrededor de 492 nt, alrededor de 493 nt, alrededor de 494 nt, alrededor de 495 nt, alrededor de 496 nt, alrededor de 497 nt, alrededor de 498 nt o alrededor de 499 nt de la SEQ ID NO:1.

[0096] Algunos promotores específicos del cono de este aspecto de la divulgación tienen una secuencia nucleotídica que comprende desde alrededor de 150 nucleótidos hasta alrededor de 395 nucleótidos desde el extremo 3' de la SEQ ID NO: 1.

[0097] Como se mencionó, el promotor específico del cono puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tenga al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 a lo largo de la longitud del promotor específico del cono. El promotor específico del cono puede tener una secuencia que tiene al menos alrededor del 70 %, al menos alrededor del 71 %, al menos alrededor del 72 %, al menos alrededor del 73 %, al menos alrededor del 74 %, al menos alrededor del 75 %, al menos alrededor del 76 %, al menos alrededor del 77 %, al menos alrededor del 78 %, al menos alrededor del 79 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 81 %, al menos alrededor del 82 %, al menos alrededor del 83 %, al menos alrededor del 84 %, al menos alrededor del 85 %, al menos alrededor del 86 %, al menos alrededor del 87 %, al menos alrededor del 88 %, al menos alrededor del 89 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 91 %, al menos alrededor del 92 %, al menos alrededor del 93 %, al menos alrededor del 94 %, al menos alrededor del 95 %, al menos alrededor del 96 %, al menos alrededor del 97 %, al menos alrededor del 98 %, al menos alrededor del 99 % o mayor identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1 a lo largo de la longitud del promotor específico del cono. Preferentemente, el promotor específico del cono puede tener al menos un 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 a lo largo de la longitud del promotor específico del cono.

[0098] El promotor específico del cono puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de

10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20 o más alteraciones de ácidos nucleicos, por ejemplo, sustituciones o deleciones, con respecto a una secuencia alineada de la misma longitud de la SEQ ID NO: 1.

5 **[0099]** Un promotor específico del cono ilustrativo puede comprender una secuencia de alrededor de 395 nt que tiene al menos un 70 % de identidad con el extremo 3' de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el promotor específico del cono puede comprender la SEQ ID NO: 12. El promotor específico del cono puede comprender una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 12. Un promotor específico del cono ilustrativo puede comprender una secuencia de alrededor de
10 290 nt que tiene al menos un 70 % de identidad con el extremo 3' de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el promotor específico del cono puede comprender la SEQ ID NO: 13. El promotor específico del cono puede comprender una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 13. Un promotor específico del cono ilustrativo puede comprender una secuencia de alrededor de
15 185 nt que tiene al menos un 70 % de identidad con el extremo 3' de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el promotor específico del cono puede comprender la SEQ ID NO: 14 que se puede denominar ProSC. El promotor específico del cono puede comprender una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 14. Un promotor específico del cono ilustrativo puede comprender una secuencia de alrededor de 150 nt que tiene al menos un 70 % de identidad con el extremo 3' de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el promotor específico del cono puede comprender la SEQ ID NO: 15. El promotor
20 específico del cono puede comprender una secuencia nucleotídica que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 15.

[0100] En algunas modalidades, el promotor contiene un promotor específico del cono que comprende la SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15.

[0101] Los promotores específicos del cono pueden estar presentes en una o más copias. De manera
25 alternativa o adicional, se pueden incluir secuencias de uno o más promotores específicos del cono. Ejemplos de dichos otros promotores incluyen hG1.7 (SEQ ID NO: 20) y PR1.7 (SEQ ID NO: 19).

[0102] El promotor específico del cono y cualquier otra secuencia promotora específica del cono (si está incluida) pueden incluirse cada una en el promotor como una sola copia o como múltiples copias. En algunas modalidades, el promotor puede comprender dos o más promotores específicos del cono. Cuando
30 se incluyen dos o más promotores específicos del cono en el promotor, no es necesario que los dos promotores específicos del cono sean idénticos, siempre que cada uno cumpla individualmente los

criterios establecidos en este documento con respecto a los promotores específicos del cono. Por ejemplo, cada promotor específico del cono puede estar presente en una a alrededor de 10 copias (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 copias).

[0103] En los promotores que carecen de segundas secuencias nucleotídicas y que comprenden dos o más promotores específicos del cono, el o los promotores específicos del cono se pueden colocar en cualquier orden deseado, y con o sin otras secuencias entre ellos.

[0104] En algunas modalidades, el promotor puede comprender una o más unidades, en donde cada unidad comprende uno o más promotores específicos del cono en cualquier orden deseado. Por ejemplo, el promotor puede comprender de 1 a alrededor de 4 unidades promotoras de promotores específicos del cono.

[0105] En algunas modalidades, el promotor puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3 o alrededor de 4 unidades, cada una de las cuales comprende, de 5' a 3', la SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, el promotor puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3 o alrededor de 4 unidades, cada una de las cuales comprende, de 5' a 3', la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el promotor puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3 o alrededor de 4 unidades, cada una de las cuales comprende, de 5' a 3', la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, el promotor puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3 o alrededor de 4 unidades, cada una de las cuales comprende, de 5' a 3', la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 14. En algunas modalidades, el promotor puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3 o alrededor de 4 unidades, cada una de las cuales comprende, de 5' a 3', la SEQ ID NO: 14 y la SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, el promotor puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3 o alrededor de 4 unidades, cada una de las cuales comprende, de 5' a 3', la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 15. En algunas modalidades, el promotor puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3 o alrededor de 4 unidades, cada una de las cuales comprende, de 5' a 3', la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, el promotor puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3 o alrededor de 4 unidades, cada una de las cuales comprende, de 5' a 3', la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 12. En algunas modalidades, el promotor puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3 o alrededor de 4 unidades, cada una de las cuales comprende, de 5' a 3', la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el promotor puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3 o alrededor de 4 unidades, cada una de las cuales comprende, de 5' a 3', la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el promotor puede comprender

[illegible]

de 5' a 3', la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 14. En algunas modalidades, el promotor puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3 o alrededor de 4 unidades, cada una de las cuales comprende, de 5' a 3', la SEQ ID NO: 14 y la SEQ ID NO: 15. En algunas modalidades, el promotor puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3 o alrededor de 4 unidades, cada una de las cuales comprende, de 5' a 3', la SEQ ID NO: 15 y la SEQ ID NO: 15.

B. Ácidos nucleicos que incluyen un promotor

[0106] Esta divulgación también se refiere a ácidos nucleicos que incluyen un promotor sintético que comprende una primera secuencia nucleotídica, que incluye promotores sintéticos que comprenden además una segunda secuencia nucleotídica, y/o un promotor sintético que comprende una secuencia promotora específica del cono, como se describe en este documento. Los ácidos nucleicos normalmente están diseñados para la expresión de la proteína y/o el ácido nucleico deseado (normalmente codificado por un transgén en el ácido nucleico) en los fotorreceptores del cono. Los ácidos nucleicos pueden estar en forma, por ejemplo, de un vector, tal como un vector de AAV, un vector lentiviral u otro vector adecuado. Por consiguiente, los ácidos nucleicos incluirán un promotor híbrido como se describe en este documento y un transgén que codifica una proteína o ácido nucleico deseado. Los ácidos nucleicos también incluirán típicamente elementos reguladores que son conocidos en la técnica y se seleccionan en función del nivel de expresión deseado, el vector de administración y otras consideraciones. Por ejemplo, el transgén está en general unido operativamente a una señal de poliA. En este documento se describen brevemente ejemplos ilustrativos y no taxativos de elementos reguladores.

a. Elemento regulador de la postranscripción

[0107] Un elemento regulador ilustrativos es un elemento regulador postranscripcional, como el elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). Los elementos reguladores son secuencias de ácidos nucleicos que contribuyen a la regulación de la expresión de una secuencia de ADN dentro de la cual se encuentra el elemento regulador. Un elemento regulador puede incluir, en algunos casos, tres componentes (alfa, beta y gamma). La actividad del elemento regulador puede depender de cuántos componentes estén presentes.

[0108] Como se divulga y ejemplifica en este documento, un elemento WPRE en combinación con un promotor de esta divulgación puede dar como resultado altos niveles de expresión de un polipéptido heterólogo o un ARN heterólogo (por ejemplo, codificado por un transgén) en conos humanos.

[0109] El elemento regulador puede estar unido operativamente a un nucleótido que codifica un polipéptido heterólogo o un ARN heterólogo y otros elementos de control de la expresión, por ejemplo,

el promotor y una señal de poliadenilación (PoliA).

[0110] Se puede utilizar cualquier elemento regulador adecuado, como un WPRE natural o un WPRE que comprende una o más mutaciones en la región X. Por ejemplo, un WPRE adecuado con mutación en la región X se divulga en la patente estadounidense n.º 7,419,829 y se presenta aquí como la SEQ ID NO: 8.

5 [0111] Se ha descrito un WPRE adecuado en la publicación estadounidense n.º US 2021/0032656. En términos generales, el WPRE puede tener una secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 7. El WPRE puede comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 70 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7. El WPRE puede tener una secuencia nucleotídica que tiene al menos
10 alrededor de 70 %, alrededor de 71 %, alrededor de 72 %, alrededor de 73 %, alrededor de 74 %, alrededor de 75 %, alrededor de 76 %, alrededor de 77 %, alrededor de 78 %, alrededor de 79 %, alrededor de 80 %, alrededor de 81 %, alrededor de 82 %, alrededor de 83 %, alrededor de 84 %, alrededor de 85 %, alrededor de 86 %, alrededor de 87 %, alrededor de 88 %, alrededor de 89 %, alrededor de 90 %, alrededor de 91 %, alrededor de 92 %, alrededor de 93 %, alrededor de 94 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7.

15 [0112] El WPRE puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20 o más alteraciones de ácidos nucleicos, por ejemplo, sustituciones o deleciones. La sustitución de ácidos nucleicos puede ser una sustitución conservadora o
20 una sustitución no conservadora, pero preferentemente es una sustitución conservadora.

b. Señal de poliadenilación

[0113] El ácido nucleico también puede incluir una secuencia nucleotídica que codifica una señal de poliA adecuada. Convenientemente, la secuencia nucleotídica que codifica la poliA está unida operativamente con la secuencia nucleotídica que codifica la proteína o el ácido nucleico deseados para su expresión. Se
25 puede utilizar cualquier señal de PoliA adecuada, como por ejemplo una señal de PoliA de SV40, una señal de PoliA de beta-globina de conejo, una señal de PoliA de hormona de crecimiento humana (hGH), una señal de PoliA de hormona de crecimiento bovina y similares. La poliA de la hormona de crecimiento humana (hGH) (SEQ ID NO: 9) es una poliA preferida.

[0114] La PoliA puede estar en cualquier orientación adecuada, preferentemente, la PoliA está en
30 dirección 3' de cualquier elemento regulador.

[0115] La PoliA puede tener una secuencia nucleotídica que comprende la SEQ ID NO: 9. La PoliA puede

comprender una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos un 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 9. La PoliA puede tener una secuencia nucleotídica que tiene al menos alrededor de 70 %, alrededor de 71 %, alrededor de 72 %, alrededor de 73 %, alrededor de 74 %, alrededor de 75 %, alrededor de 76 %, alrededor de 77 %, alrededor de 78 %, alrededor de 79 %, alrededor de 80 %, alrededor de 81 %, alrededor de 82 %, alrededor de 83 %, alrededor de 84 %, alrededor de 85 %, alrededor de 86 %, alrededor de 87 %, alrededor de 88 %, alrededor de 89 %, alrededor de 90 %, alrededor de 91 %, alrededor de 92 %, alrededor de 93 %, alrededor de 94 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 % o más de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9.

[0116] La PoliA puede comprender alrededor de 1, alrededor de 2, alrededor de 3, alrededor de 4, alrededor de 5, alrededor de 6, alrededor de 7, alrededor de 8, alrededor de 9, alrededor de 10, alrededor de 11, alrededor de 12, alrededor de 13, alrededor de 14, alrededor de 15, alrededor de 16, alrededor de 17, alrededor de 18, alrededor de 19, alrededor de 20 o más alteraciones de ácidos nucleicos, por ejemplo, sustituciones o deleciones. La sustitución de ácidos nucleicos puede ser una sustitución conservadora o una sustitución no conservadora, pero preferentemente es una sustitución conservadora.

c. Secuencias de empaquetamiento

[0117] El ácido nucleico puede comprender además una secuencia de empaquetamiento adecuada o una señal para empaquetarse en un vector viral, tal como un AAV o un vector lentiviral. Por ejemplo, el ácido nucleico puede incluir una repetición terminal invertida ITR, tal como una AAV ITR. Esto puede ser especialmente apropiado si el ácido nucleico se va a incorporar a un vector de AAV. Normalmente se incluyen dos ITR en el ácido nucleico, uno en el extremo 5' y otro en el extremo 3'. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender una AAV ITR 5' del promotor y una AAV ITR en el extremo 3'. Ejemplos particulares de AAV ITR son la SEQ ID NO: 10 y la SEQ ID NO: 11.

[0118] Las ITR pueden seleccionarse independientemente de las ITR de tipo salvaje y, opcionalmente, de las ITR autocomplementarias (scAAV). También se pueden utilizar otras secuencias (por ejemplo, repeticiones terminales de parvovirus) que sean funcionalmente equivalentes a las AAV ITR 5' y/o AAV ITR 3'.

C. Transgén

[0119] El ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido o ácido nucleico deseado. Normalmente, el polipéptido es heterólogo al promotor sintético, lo que significa que la primera secuencia nucleotídica, la segunda secuencia nucleotídica (en modalidades en donde el promotor sintético comprende una segunda secuencia nucleotídica), una secuencia promotora específica

del cono y/o cualquier otra secuencia promotora que pueda incluirse en el promotor sintético no impulsan la expresión del polipéptido en la naturaleza. El promotor sintético y la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido están unidos operativamente. El nucleótido puede codificar cualquier polipéptido heterólogo cuya expresión se desee en los conos.

5 **[0120]** El polipéptido heterólogo puede ser un polipéptido terapéutico, una proteína indicadora o un accionador optogenético, como los que se describen a continuación.

[0121] En algunas modalidades, la secuencia nucleotídica codifica un polipéptido terapéutico, con lo que se quiere decir que la secuencia nucleotídica puede rescatar un gen faltante o mutado que se sabe que causa una enfermedad de la retina. Ejemplos de enfermedades de la retina causadas por genes faltantes o mutados, y que, por lo tanto, pueden ser rescatadas por la secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido terapéutico, incluyen, de modo no taxativo, MT-ND4 (ID del gen: 4538), MT-ND1 (ID del gen: 4535), MT-ND6 (ID del gen: 4541), MT-CYB (ID del gen: 4519), MT-C03 (ID del gen: 4514), MT-ND5 (ID del gen: 4540), MT-ND2 (ID del gen: 4536), MT-COI (ID del gen: 4512), MT-ATP6 (ID del gen: 4508), MT-ND4L (ID del gen: 4539), OPA1 (ID del gen: 4976), OPA3 (ID del gen: 80207), OPA7 (ID del gen: 84233), AC02 y (ID del gen: 50). La secuencia nucleotídica puede codificar factores neurotróficos como GDNF (ID del gen: 2668), CNTF (ID del gen: 1270), FGF2 (ID del gen: 2247), BDNF (ID del gen: 627) y EPO (ID del gen: 2056), genes antiapoptóticos como BCL2 (ID del gen: 596) y BCL2L1 (ID del gen: 598), factores antiangiogénicos como endostatina, angiostatina y sFlt, factores antiinflamatorios como IL10 (ID del gen: 3586), IL1R1 (ID del gen: 3554), TGFBI (ID del gen: 7045) e IL4 (ID del gen: 3565), o el factor de viabilidad de conos derivado de bastones (RdCVF, por su sigla en inglés) (ID del gen: 115861).

[0122] Se puede añadir un péptido señal a los polipéptidos terapéuticos, en particular para dirigir su importación por ciertos orgánulos (como las mitocondrias), para secretarlos de la célula o para insertarlos en la membrana celular.

25 **[0123]** En otra modalidad, el polipéptido heterólogo puede ser un accionador optogenético, que es un polipéptido fotoquímicamente reactivo que utiliza la vitamina A o isoformas de esta como su cromóforo. Un accionador optogenético en particular es una bomba o canal de iones controlado por luz que absorbe luz y es activado por la luz. El accionador optogenético puede ser de un organismo procariota o de un organismo eucariota. En particular, puede ser una opsina microbiana o una opsina de vertebrados. El accionador optogenético puede ser un activador optogenético o un inhibidor optogenético.

30 **[0124]** Un activador optogenético hace que una célula se despolarice tras exponerse a la luz. Los ejemplos

de activadores optogenéticos incluyen rodopsinas, fotopsinas, melanopsinas, pinopsinas, parapinopsinas, opsinas VA, peropsinas, neuropsinas, encefalopsinas, retinocromos, opsinas RGR, opsinas microbianas con propiedades espectrales desplazadas al rojo tales como ReaChR, Chrimson o ChrimsonR, opsinas de vertebrados que pueden reclutar la señalización de Gi/0 tales como opsina de vertebrados de longitud de onda corta u opsina de vertebrados de longitud de onda larga, canalrodopsinas de microalgas del género *Chlamydomonas*, tales como canalrodopsina-1, canalrodopsina-2 (de *Chlamydomonas reinhardtii*), y variantes optimizadas o funcionalmente mejoradas (por ejemplo, variantes optimizadas por codones, mutantes, quimeras) de estas opciones.

[0125]

- 10 **[0126]** En algunas modalidades, el accionador optogenético puede ser un activador optogenético, seleccionado preferentemente entre canalrodopsinas, ChrimsonR y variantes de estas, tales como hChR2 (L132C)-hCatCh y ChrimsonR-tdTomato.

[0127] En algunas modalidades, el accionador optogenético es un activador optogenético, seleccionado preferentemente entre canalrodopsinas y variantes de estas, tales como hChR2 (L132C)-hCatCh.

- 15 **[0128]** Un inhibidor optogenético hace que una célula se hiperpolarice tras exponerse a la luz. Ejemplos de inhibidores optogenéticos incluyen, de modo no taxativo, halorrodopsinas tales como halorrodopsina (NpHR), halorrodopsinas potenciadas (eNpHR2.0 y eNpHR3.0) y la halorrodopsina desplazada al rojo Halo57, arquerodopsina-3 (AR-3), arquerodopsina (Arch), bacteriorrodopsinas tales como bacteriorrodopsina potenciada (eBR), proteorrodopsinas, xantorrodopsinas, opsinas fúngicas de *Leptosphaeria maculans* (Mac), la cruxhalorrodopsina Jaws y variantes optimizadas o funcionalmente mejoradas (por ejemplo, variantes optimizadas por codones, mutantes, quimeras) de estas opciones.

- 20 **[0129]** En algunas modalidades, el ácido nucleico unido operativamente al promotor de la invención puede codificar una proteína indicadora. Preferentemente, la proteína indicadora puede ser detectable en células fotorreceptoras de cono vivas. La expresión de una proteína indicadora bajo el control de un promotor de la divulgación permite la detección o identificación específica de células fotorreceptoras del cono. La proteína indicadora puede ser, por ejemplo, una proteína fluorescente (por ejemplo, GFP), un indicador de calcio (por ejemplo, GCaMP), luciferasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, beta-lactamasa, peroxidasa de rábano picante y variantes de estas.

- 25 **[0130]** En algunas modalidades, la proteína indicadora se puede seleccionar del grupo que consiste en proteínas fluorescentes, indicadores de calcio, fosfatasas alcalinas, beta-galactosidasas, beta-lactamasas, peroxidasa de rábano picante y variantes de estas.

[0131] El ácido nucleico puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica un ARN heterólogo al promotor sintético, lo que significa que la primera secuencia nucleotídica, la segunda secuencia nucleotídica (en modalidades en donde el promotor sintético comprende una segunda secuencia nucleotídica), una secuencia promotora específica del cono y/o cualquier otra secuencia promotora que pueda incluirse en el promotor sintético no impulsan la expresión del ARN en la naturaleza. El promotor sintético y la secuencia nucleotídica que codifica el ARN están unidos operativamente. El nucleótido puede codificar cualquier ARN heterólogo cuya expresión se desee en los conos.

[0132] En algunas modalidades, el ARN heterólogo puede ser un ARN terapéutico. El ARN puede ser, por ejemplo, un ARNip, un ARNhc, un iARN, un miARN, un ARN antisentido o un ribozima. En algunas modalidades particulares, la secuencia nucleotídica codifica un ARN heterólogo que, cuando se transcribe a partir de la secuencia nucleotídica unida operativamente al promotor, puede tratar o prevenir una enfermedad ocular al interferir con la traducción o transcripción de una proteína anormal o en exceso asociada con dicho trastorno.

[0133] Los ácidos nucleicos descritos en este documento, o cualquier componente de estos (por ejemplo, promotor, secuencia que codifica una proteína optogenética despolarizante), se pueden optimizar mediante variación de secuencia utilizando métodos conocidos, por ejemplo, para alcanzar niveles deseados de expresión, para reducir la inmunogenicidad o para otros fines. Los métodos adecuados para optimizar la construcción de ácidos nucleicos mediante alteración de secuencia, lo que incluye, por ejemplo, aumentar la expresión, empaquetar y/o disminuir la inmunogenicidad, son conocidos en la técnica y dichas modificaciones de los ácidos nucleicos divulgados en este documento se consideran variantes de los ácidos nucleicos particulares. Por ejemplo, los ácidos nucleicos descritos en este documento, o cualquier componente de estos, pueden optimizarse por codones, agotar los CpG (ver, por ejemplo, la patente de estadounidense 11,015,210; Y. A. Medvedeva, et al, *Bioinformatics-Trends and Methodologies*, 449-472 (2011)), modificarse para eliminar secuencias repetidas y de horquilla, modificarse para eliminar marcos de lectura alternativos, modificarse para eliminar sitios donantes y aceptores de empalme no deseados, modificarse para añadir una secuencia de relleno, modificarse para incluir una secuencia de ARNbc o ARNg (ver, por ejemplo, Domenger y Grimm, *Human Molecular Genetics*, 2019, 28:R1-R12), modificarse para incluir un sistema de control inducible (por ejemplo, sistema Tet-on/off) (ver, por ejemplo, Gossen et al, *Science*, 268: 1766-1769 (1995); Harvey et al, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2:512-518 (1998)), o modificado para incluir una ITR eliminada de la secuencia del sitio de resolución terminal (trs) para generar un scAAV (ver, por ejemplo, McCarty et al., *Gene Therapy*, 2001, 16:1248-54)). Los

métodos para optimizar los ácidos nucleicos descritos en este documento son convencionales y conocidos por los expertos en la técnica.

D. Vectores

5 [0134] La divulgación se refiere además a vectores recombinantes que comprenden el ácido nucleico divulgado en este documento o una célula hospedadora que comprende el vector. Un vector de AAV puede basarse en un genoma viral con la cápside y otras proteínas estructurales eliminadas. Los vectores proporcionados en este documento pueden ser adecuados para la terapia génica y, en particular, pueden ser adecuados para dirigirse a los conos humanos. Como se divulga en el presente documento, el ácido nucleico comprende un promotor sintético y puede comprender una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido o ARN heterólogo, un elemento regulador y una señal de poliA adecuada. Cada una de las
10 secuencias nucleotídicas está unida operativamente.

[0135] Además, el vector puede comprender elementos adicionales para la expresión del ácido nucleico. Por ejemplo, el vector puede comprender una o más ITR, un elemento de unión a ribosomas, un terminador, un potenciador, un marcador de selección, un intrón, una señal de poliA y/o un origen de
15 replicación.

[0136] En algunas modalidades, el vector de AAV es un AAV monocatenario (ssAAV, por su sigla en inglés). En algunas modalidades, el vector de AAV es un AAV autocomplementario (scAAV, por su sigla en inglés).

[0137] Los expertos en la técnica conocen muchos vectores virales y no virales diferentes y métodos para su administración, tales como vectores de adenovirus, vectores de AAV, vectores de retrovirus, vectores
20 lentivirales, vectores de virus del herpes, liposomas, administración de ADN libre y similares. Ver, por ejemplo, Wright (1997), Br. J. Ophthalmol., 8(1):620-622. Existen numerosos vectores adecuados disponibles comercialmente. Estos vectores suelen incluir señales de poliadenilación, etc., junto con múltiples sitios de clonación, así como elementos adicionales como orígenes de replicación, genes
25 marcadores seleccionables (por ejemplo, LEU2, URA3, TRP 1, HIS3, GFP), secuencias centroméricas, etc.

[0138] El vector adecuado para el ácido nucleico divulgado en este documento puede ser un vector viral, tal como vectores derivados de vectores del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), MSCV, SFFV, MPSV o SNV, vectores lentivirales (por ejemplo, derivados del virus de la inmunodeficiencia
30 humana (HIV), virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV), virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV) o virus de la anemia infecciosa equina (EIAV)),

vectores adenovirales (Ad), vectores de AAV, vectores del virus de los simios 40 (SV-40), vectores del virus del papiloma bovino, virus de Epstein-Barr, vectores del virus del herpes, vectores del virus de la variolovacuna, vectores del virus del sarcoma murino de Harvey, vectores del virus del tumor mamario murino y vectores del virus del sarcoma de Rous.

5 [0139] El vector puede ser un vector retroviral, como un vector lentiviral o un parvovirus no patógeno.

[0140] En algunas modalidades particulares, el vector puede ser un vector viral de AAV que comprende una cápside de AAV. Sin limitarse a la teoría, la cápside de AAV puede mejorar la administración selectiva del ácido nucleico a los conos y también puede mejorar la expresión del polipéptido o ARN heterólogo.

10 [0141] En la técnica se conocen muchas cápsides y estructuras virales de AAV adecuadas y se conocen múltiples serotipos de cápsides de AAV que pueden ser adecuados para las construcciones optogenéticas divulgadas en este documento. Se han descrito en la bibliografía al menos dieciséis serotipos de AAV, denominados AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV 12, AAV13, AAV 14, AAV15 y AAV16. También se conocen en la técnica muchas cápsides modificadas y variantes.

15 [0142] Las cápsides de AAV ilustrativas incluyen, entre otras, AAV8-BP2, AAV-PHP.B, AAV-PHP.eB, AAV5 o AAV-NHP26. Las proteínas de la cápside de AAV preferidas son AAV-PHP.eB, AAV8-BP2 o AAV5.

20 [0143] Como alternativa al uso de serotipos naturales de AAV, se pueden utilizar serotipos de AAV artificiales, como AAV con una cápside que no se produce de forma natural. Dicha cápside artificial puede generarse mediante cualquier técnica adecuada, usando una secuencia de AAV seleccionada (por ejemplo, un fragmento de una proteína de la cápside de VP1) en combinación con secuencias heterólogas que pueden obtenerse de un serotipo de AAV seleccionado diferente, porciones no contiguas del mismo serotipo de AAV, de una fuente viral no AAV o de una fuente no viral. Un serotipo de AAV artificial puede ser, de modo no taxativo, una cápside de AAV quimérica o una cápside de AAV mutada. Una
25 cápside quimérica comprende proteínas de la cápside de VP derivadas de al menos dos serotipos de AAV diferentes o comprende al menos una proteína VP quimérica que combina regiones o dominios de proteína VP derivados de al menos dos serotipos de AAV.

[0144] Las proteínas de la cápside de AAV también pueden mutarse, en particular para potenciar la eficiencia de la transducción. Las cápsides de AAV mutadas pueden obtenerse a partir de modificaciones
30 de la cápside insertadas mediante PCR propensa a errores y/o inserción de péptidos o mediante la inclusión de una o varias sustituciones de aminoácidos. En particular, se pueden hacer mutaciones en uno o más

residuos de tirosina de proteínas de cápsides naturales o no naturales (por ejemplo, VP1, VP2 o VP3). Los residuos mutados pueden ser residuos de tirosina expuestos en la superficie. Las mutaciones ilustrativas incluyen, de modo no taxativo, sustituciones de tirosina a fenilalanina como Y252F, Y272F, Y444F, Y500F, Y700F, Y704F, Y730F, Y275F, Y281F, Y508F, Y576F, Y612G, Y673F e Y720F.

5 [0145] El vector puede estar en cualquier forma, lo que incluye, de modo no taxativo, partículas virales, tales como partículas rAAV que incluyen un ácido nucleico que codifica una proteína optogenética despolarizante como se describe en este documento. Si se desea, los ácidos nucleicos que codifican una proteína optogenética despolarizante como se describe en este documento se pueden combinar con otros agentes de administración de ácidos nucleicos adecuados, por ejemplo, en complejo con lípidos, 10 encapsulados dentro de liposomas, para su administración.

[0146] El ácido nucleico que codifica una proteína optogenética despolarizante divulgada en este documento puede empaquetarse en una cápside de virus para generar una partícula viral, preferentemente una partícula de AAV.

[0147] La partícula viral es capaz de transducir hasta alrededor del 10 % de los conos humanos primarios. 15 Por ejemplo, la partícula viral puede ser capaz de transducir alrededor del 10 %, alrededor del 15 %, alrededor del 20 %, alrededor del 25 %, alrededor del 30 %, alrededor del 35 %, alrededor del 40 %, alrededor del 45 %, alrededor del 50 %, alrededor del 55 %, alrededor del 60 %, alrededor del 65 %, alrededor del 70 %, alrededor del 75 %, alrededor del 80 %, alrededor del 85 %, alrededor del 90 %, alrededor del 91 %, alrededor del 92 %, alrededor del 93 %, alrededor del 94 %, alrededor del 95 %, 20 alrededor del 96 %, alrededor del 97 %, alrededor del 98 %, alrededor del 99 %, alrededor del 100 % de los conos humanos primarios.

[0148] También se proporcionan aquí métodos de producción y cultivos para la producción de partículas de virus. El cultivo puede comprender células hospedadoras adecuadas, que incluyen, por ejemplo, líneas celulares derivadas de humanos tales como células HeLa, A549 o HEK293, función de virus auxiliar 25 adecuada, proporcionada por adenovirus de tipo salvaje o mutante, por ejemplo, adenovirus sensible a la temperatura, virus del herpes, o una construcción de plásmido que proporciona funciones auxiliares; genes rep y cap de AAV y productos génicos, el ácido nucleico divulgado en este documento o un vector que comprende el ácido nucleico, y medios y componentes de medios adecuados para sustentar la producción de partículas virales que son conocidos en la técnica.

30 [0149] Las células hospedadoras adecuadas pueden incluir, de modo no taxativo, células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, microorganismos y levaduras. Las células hospedadoras también

pueden ser células de empaquetamiento. Los ejemplos de células de empaquetamiento y productoras derivan de células HEK293, A549 o HeLa.

[0150] La célula hospedadora divulgada en este documento puede transformarse o transfectarse con un vector que comprende el ácido nucleico divulgado en este documento o una partícula viral. La célula hospedadora puede ser cualquier célula animal, célula vegetal, célula bacteriana o levadura. El vector divulgado en este documento puede transferirse a células hospedadoras utilizando cualquier técnica conocida, incluida la infección viral, y puede mantenerse en la célula hospedadora en forma ectópica o puede integrarse en el genoma.

E. Composiciones farmacéuticas

[0151] La divulgación también se refiere a composiciones farmacéuticas que pueden comprender un ácido nucleico, un vector o una célula hospedadora. La composición farmacéutica se puede administrar a un sujeto con el fin de restaurar la sensibilidad a la luz de los conos humanos, en particular los conos humanos que no se activan con fotoestimulación, de modo que se pueda restaurar la visión en un sujeto. Las composiciones que comprenden el ácido nucleico pueden ser adecuadas para la administración a un sujeto.

La composición farmacéutica puede suministrarse como una solución líquida, una suspensión, una emulsión o como formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de su uso.

[0152] La composición farmacéutica puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable, es decir, cualquier portador que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes y que no sea tóxico para el sujeto al que se administra. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados son conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas amortiguadas con fosfato, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Dichos portadores pueden formularse mediante métodos convencionales y pueden administrarse al sujeto en una dosis adecuada. Preferentemente, las composiciones son estériles. Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos puede garantizarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos.

[0153] Los portadores adecuados y sus formulaciones se describen en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21.^a edición, David B. Troy, ed., Lippincott Williams & Wilkins (2005). Típicamente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable en la formulación para hacer que la formulación sea isotónica, aunque la formulación puede ser hipertónica o hipotónica si se desea. Los ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, agua

esterilizada, solución salina, soluciones amortiguadas como la solución de Ringer y solución de dextrosa. El pH de la solución es generalmente de alrededor de 5 a alrededor de 8 o de alrededor de 7 a 7,5. Otros portadores incluyen preparaciones de liberación sostenida tales como matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen los polipéptidos inmunogénicos. Las matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, liposomas o micropartículas. Ciertos portadores pueden ser más preferibles dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración y la concentración de la composición que se administre. Se pueden administrar portadores adecuados para administración directa al ojo sin toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros, sorbitol, cualquiera de los diversos compuestos tween y líquidos como agua, solución salina, glicerol y etanol. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden incluir allí, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Más preferentemente, la composición se combina con solución salina, solución salina equilibrada de Ringer (pH 7,4) y similares.

[0154] La composición farmacéutica puede comprender opcionalmente uno o más agentes que facilitan la administración de un ácido nucleico o un vector a una célula diana, lo que incluye, entre otros, reactivos de transfección o componentes de estos, tales como lípidos o polímeros.

[0155] La composición farmacéutica divulgada en este documento puede formularse para administración al ojo, en particular mediante inyección intraocular, por ejemplo, mediante administración subretiniana y/o intravítrea o supracoroidea. Para administración intravítrea, la composición farmacéutica divulgada en este documento se puede inyectar directamente en el vítreo. Para la administración subretinal, la composición farmacéutica divulgada en este documento se puede administrar en una ampolla subretinal localizada entre el epitelio pigmentario de la retina (RPE) y la capa de fotorreceptores en un procedimiento quirúrgico. Esto se puede lograr durante la vitrectomía pars plana (ppV, por su sigla en inglés). La administración subretinal puede proporcionar acceso directo a los fotorreceptores y al RPE. La inyección supracoroidea puede proporcionar acceso a los fotorreceptores de la capa coroidea. De manera alternativa, la composición farmacéutica puede administrarse en la sección anterior del ojo, en particular en la cámara anterior. La inyección subretiniana es el modo de administración preferido.

[0156] La cantidad de composición farmacéutica que se debe administrar se puede determinar mediante un procedimiento estándar conocido por los expertos en la técnica. Para determinar la dosis adecuada, se deben tener en cuenta los datos fisiológicos del paciente (por ejemplo, edad, tamaño y peso) y el tipo y la gravedad de la enfermedad que se está tratando.

- [0157] La composición farmacéutica puede formularse para administración mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección subretiniana o intravítrea o inyección supracoroidea. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma farmacéutica unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes de múltiples dosis. Las composiciones pueden tomar formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. De manera alternativa, el ingrediente activo puede encontrarse en forma de polvo para constituirse con un vehículo adecuado, p. ej., agua estéril y libre de pirógenos, antes de su uso.
- [0158] La composición farmacéutica divulgada en este documento también puede formularse como una preparación inyectable de liberación prolongada o para su uso en un sistema de administración implantado. Estas formulaciones de acción prolongada pueden administrarse mediante implantación, por ejemplo, intraocular, o mediante inyección intraocular. La composición farmacéutica también puede formularse como una preparación inyectable de liberación prolongada para su uso en un sistema o dispositivo de administración de fármacos implantado, en particular para la recarga repetida de un depósito en el sistema o dispositivo de administración de fármacos implantado. Por tanto, la composición farmacéutica puede formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico o como derivados de solubilidad limitada, por ejemplo, como una sal de solubilidad limitada.
- [0159] En una modalidad, la composición farmacéutica divulgada en este documento puede comprender un vector o partícula viral que comprende el ácido nucleico divulgado en este documento. Preferentemente, el vector o partícula viral es un vector o partícula AAV. La composición farmacéutica puede comprender células hospedadoras que comprenden el ácido nucleico divulgado en este documento o la partícula viral que comprende el ácido nucleico.
- [0160] Opcionalmente, la composición farmacéutica que comprende células hospedadoras puede congelarse para su almacenamiento a cualquier temperatura apropiada para el almacenamiento de las células. La composición farmacéutica puede comprender partículas virales y cada dosis unitaria comprende de $10E+8$ a $10E+13$ partículas virales medidas por reacción en cadena de la polimerasa utilizando una sonda específica para el genoma del virus.
- [0161] La composición farmacéutica puede comprender además uno o varios compuestos activos adicionales tales como corticosteroides, antibióticos, analgésicos, inmunosupresores, factores tróficos o cualquier combinación de estos.

F. Kits

[0162] También se divulgan en este documento kits que comprenden el ácido nucleico divulgado en este documento, vectores que comprenden el ácido nucleico, partículas virales que comprenden el ácido nucleico, células hospedadoras o una composición farmacéutica de estos.

[0163] El kit puede estar en forma de una solución farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, en combinación con solución salina estéril, solución de dextrosa o solución amortiguada u otro fluido estéril farmacéuticamente aceptable. De manera alternativa, el complejo puede liofilizarse o desecarse; en este caso, el kit comprende opcionalmente además en un recipiente una solución farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina, solución de dextrosa, etc.), para reconstituir el complejo y formar una solución para fines de inyección.

[0164] Un kit puede comprender además una aguja o jeringa, preferentemente envasada en forma estéril, para inyectar el complejo, y/o una gasa con alcohol envasada. Opcionalmente se incluyen instrucciones para la administración de las composiciones por parte de un médico o por el paciente.

G. Métodos

[0165] La divulgación también se refiere a métodos para expresar un polipéptido heterólogo o un ARN heterólogo en células fotorreceptoras del cono, por ejemplo, en cultivo, en un organoide de la retina, un explante de la retina o un sujeto mamífero. El método puede comprender administrar al organoide de la retina, al explante de la retina o al sujeto mamífero un ácido nucleico, un vector, una célula hospedadora o dos o más de estos como se describe en este documento. El polipéptido o ARN heterólogo puede expresarse en los conos.

[0166] Los métodos se pueden utilizar en estudios de la función del polipéptido o ARN heterólogo en organoides o explantes de la retina. Los métodos se pueden utilizar con sujetos mamíferos para investigación, profilaxis o tratamiento de enfermedades o trastornos de la visión de los mamíferos, como la ceguera.

[0167] Los métodos ilustrativos incluyen métodos que comprenden administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad eficaz de un ácido nucleico que comprende un transgén divulgado en este documento, un vector que comprende el ácido nucleico divulgado en este documento, o una composición farmacéutica de este, para tratar una enfermedad de la retina mediante la expresión del transgén en los conos de la retina.

[0168] El vector puede ser un vector de AAV. El ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica de este se pueden administrar mediante inyección subretiniana. El ácido nucleico, el vector o la composición farmacéutica se pueden administrar antes, después o al inicio de la enfermedad de la retina.

[0169] Los métodos divulgados en este documento pueden ser útiles para tratar o mejorar la ceguera. Los

métodos divulgados en este documento pueden ser útiles para restaurar la visión. Los métodos divulgados en este documento pueden ser útiles para restaurar la sensibilidad a la luz en una célula fotorreceptora del cono humana. Los métodos divulgados en este documento pueden ser adecuados para tratar la degeneración de la retina.

5 **[0170]** Los métodos divulgados en este documento pueden ser adecuados para tratar cualquier enfermedad, trastorno o afección asociada con la pérdida de la visión, lo que incluye, retinosis pigmentaria, distrofia de conos y bastones, amaurosis congénita de Leber, síndrome de Usher, síndrome de Bardet-Biedl, enfermedad de Best, retinosquiasis, enfermedad de Stargardt, desprendimiento de la retina no tratado, distrofia de patrón, distrofia de conos y bastones, acromatopsia, albinismo ocular, síndrome del cono S potenciado, retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad, retinopatía de la prematuridad, retinopatía de células falciformes, ceguera nocturna estacionaria congénita, coroideremia, disfunción del cono posterior al desprendimiento de la retina o una oclusión de la vena retiniana por degeneración tapetoretiniana.

10 **[0171]** Además, las moléculas de ácido nucleico, los vectores o las composiciones farmacéuticas se pueden utilizar para fabricar medicamentos y/o para tratar a pacientes que padecen una enfermedad, trastorno o afección asociada a la pérdida de visión.

15 **[0172]** El sujeto puede ser un ser humano, perro, gato, caballo o cualquier animal para el cual se desee restaurar la visión.

20 **[0173]** El ácido nucleico divulgado en este documento se puede administrar al sujeto en una cantidad suficiente para restaurar al menos parcialmente la visión.

[0174] El ácido nucleico proporcionado en este documento se puede administrar al sujeto por cualquier vía adecuada, lo que incluye, de modo no taxativo, la vía intraocular (por ejemplo, inyección subretiniana, inyección intravítrea o inyección supracoroidea), oral, intradérmica, intratecal, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, tópica, subcutánea, percutánea, intranasal y por inhalación, y mediante escarificación (raspado a través de las capas superiores de la piel, por ejemplo, utilizando una aguja bifurcada). La vía de administración preferida es la administración intraocular, y la más preferida es la administración mediante inyección subretiniana.

25 **[0175]** La dosis del ácido nucleico puede depender del tipo de composición y de la edad del sujeto, el peso, la superficie corporal, la afección individual, los datos farmacocinéticos individuales y el modo de administración.

30 **[0176]** El ácido nucleico se puede administrar a un sujeto que tiene o está en riesgo de desarrollar una

afección asociada con la pérdida de visión. El ácido nucleico se puede administrar antes o después de que la enfermedad se vuelva sintomática. Por ejemplo, antes o después de la degeneración parcial o completa de los conos. El ácido nucleico se puede administrar antes o después de la pérdida de visión parcial o completa.

5. EQUIVALENTES

[0177] Será evidente para los expertos en la técnica que otras modificaciones y adaptaciones adecuadas de los métodos de la invención descritos en el presente son obvias y se pueden realizar usando equivalentes adecuados sin apartarse del alcance de la divulgación o las modalidades. Habiendo descrito ciertas composiciones y métodos en detalle, estos se entenderán más claramente con referencia a los siguientes ejemplos, que se presentan solo como ilustración y no pretenden ser taxativos.

6. EJEMPLOS

[0178] Los ejemplos a continuación son ejemplos de métodos y composiciones de la invención. Se debe entender que se pueden llevar a la práctica otras modalidades diferentes conforme a la descripción general provista en este documento.

15 Ejemplo 1. Secuencias promotoras cortas para la expresión específica de genes en fotorreceptores del cono

1.1. Métodos

Construcciones y producción de vectores

[0179] Un promotor de cono existente ProA7 que se sabe que impulsa la expresión de eGFP específicamente en los fotorreceptores del cono (Jüttner et al., 2019), así como fragmentos truncados en 3' y 5' de este, se clonaron cada uno en el plásmido de pAAV antes de la secuencia de Kozak optimizada (GCCACC) y el codón de inicio de la traducción de la secuencia codificante de eGFP, seguido de un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) y la poliadenilación de SV40. (FIG. 1)

[0180] Los vectores virales adenoasociados (AAV) del serotipo PHP.eB se produjeron en una versión compatible de alto rendimiento del método común de triple transfección descrito por Grieger et al. (2006). En resumen: se sembraron células HEK293T en una placa de 24 pocillos. Se transfectaron con la respectiva construcción de promotor junto con otros dos plásmidos (plásmido del gen RepCap, plásmido del gen auxiliar del adenovirus) necesarios para la producción de AAV en relación equimolar utilizando jetPRIME® - reactivo de transfección y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 72 h después de la transfección, se retiró el medio de las células y las células se lisaron en 50 µL de amortiguador

(150 mmol/L de NaCl, 20 mmol/L de tris pH 8,0) congelando y descongelando las células 3 veces.

[0181] Generación de organoides de la retina a partir de células madre pluripotentes inducidas humanas (Cowan et al., 2020)

[0182] Los organoides de la retina se generaron como se describió anteriormente (Zhong et al., 2014) a partir de células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSC, por su sigla en inglés). En resumen, el día 5
cero de la diferenciación, se generaron cuerpos embrionarios flotantes (EB) mediante la disociación de colonias de iPSC de un pocillo de una placa de 6 pocillos (Corning, n.º 3516) en pequeños trozos de colonia con una herramienta de pase de células (Thermo Fisher Scientific, n.º 23181010). Los EB se cultivaron en suspensión en medio mTesR1 suplementado con 10 µmol/L de blebbistatina (Sigma, n.º B0560–5MG) en placas Petri sin tratar de 3,5 cm (Corning, n.º 351008). Los días 1 y 2, un tercio del medio se intercambió con «medio de inducción neuronal» (NIM, por su sigla en inglés) que contenía DMEM/F12 (GIBCO, n.º 31331–028), 1 × suplemento N2 (GIBCO, n.º 17502–048), solución NEAA al 1 % (Sigma, n.º M7145) y 2 µg/mL de heparina (Sigma, n.º H3149–50KU). El día 3, para eliminar las células muertas y los residuos, los EB se sedimentaron por gravedad en un tubo de 15 mL, se lavaron con NIM y se cultivaron en una placa Petri sin tratar de 3,5 cm (Corning, n.º 351008) en NIM. La mitad del NIM se intercambiaba diariamente. El día 7, los EB de una placa de 3,5 cm se sembraron en una placa de 6 cm (Corning, n.º 430166) recubierta con Matrigel con factor de crecimiento reducido (Corning, n.º 356230) y luego se mantuvieron con cambios diarios de NIM.

Infección por AAV en organoides de la retina humanos

[0183] Los organoides de la retina se infectaron en la semana 26 con 100 µl de lisado de cultivo celular filtrado que contenía AAV y que portaba nuevas variantes de promotor híbrido (serotipo, AAV5) que inducían la expresión de GFP potenciada.

[0184] Los organoides individuales se colocaron en un único pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en U de fijación ultrabaja (Corning, n.º 7007) y se mantuvieron a 37 °C en CO₂ al 5 % en una mezcla de 15 µL de medio de cultivo y 100 µl de lisado celular que contenía AAV. Un día después, se agregaron 100 µL de medio recientemente preparado a cada pocillo. Después de 24 horas, y cada 48 horas a partir de entonces, la solución se intercambió completamente con medio recientemente preparado.

Cultivo de organoides de la retina infectados por AAV

[0185] Los organoides infectados se cultivaron durante 4 semanas en DMEM (GIBCO, n.º 10569-010) suplementado con mezcla de nutrientes F12 de Ham al 20 % (GIBCO, n.º 31765-027), suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (Millipore, n.º es–009–b), suplemento N2 al 1 % (GIBCO, n.º 17502-048),

solución NEAA al 1 % (Sigma, n.º M7145), 100 µmol/L de taurina (Sigma, n.º T0625) y 1 µmol/L de ácido retinoico (Sigma, n.º R2625).

Adquisición y procesamiento de imágenes en vivo de organoides completos

[0186] Se utilizó un sistema de microscopio confocal de disco giratorio «IXplore Spin» de Olympus para registrar la expresión de GFP e imágenes de campo brillante de organoides de la retina en placas de 96 pocillos utilizando un objetivo 4x.

[0187] Las proyecciones de intensidad máxima se generaron utilizando el software OLYMPUS CellSens.

[0188] Para evaluar el perfil de expresión de GFP de diferentes variantes del promotor, se compararon los siguientes tres parámetros por organoide de la retina: la cantidad de células positivas para GFP, la intensidad promedio de GFP de todas las células detectadas y la densidad celular, que se calculó dividiendo la cantidad de células positivas para GFP por el área del organoide.

[0189] La cantidad de células que expresan GFP se determina en la proyección de intensidad máxima (MIP) del canal de GFP de cada pila de imágenes. Inicialmente, se aplicó el filtrado gaussiano para reducir el nivel general de ruido. A continuación, se detectaron los máximos locales en la intensidad de píxeles y luego se filtraron en tres pasos: el primer paso eliminó los máximos locales con bajo contraste calculando una ventana ROI local y aumentando su tamaño en cada iteración. Se aplicó el umbral de Otsu en la ventana ROI y, si había píxeles en los bordes, se aumentó el tamaño de la ventana. La iteración se terminó y el máximo local se aceptó como un objeto («célula») si no había píxeles activos en los bordes después del umbral de Otsu. El tamaño máximo de la ventana ROI se estableció en 70×70 píxeles y se ignoraron los máximos locales mayores que este tamaño. Esto excluyó los objetos fluorescentes de gran tamaño.

[0190] El siguiente paso separó las células que estaban cerca entre sí. En primer lugar, estos casos se identificaron examinando el diámetro y la relación perímetro/área de cada objeto. Posteriormente, se aplicó erosión binaria para dividir objetos en contacto.

[0191] En el paso final de filtrado, se analizó el diámetro y la relación perímetro/área. La relación perímetro/área estaba más adaptada a los objetos de forma circular. Se conservaron los objetos cuyo diámetro estaba comprendido entre 6 y 100 µm.

[0192] Para el cálculo del área de organoide y la densidad celular, se utilizaron imágenes de campo claro. Los píxeles más oscuros se amplificaron aplicando una transformación gamma de 0,05. Luego se aplicó el umbral de Otsu para determinar los píxeles que pertenecen al área de organoide.

Fijación de organoides de la retina

[0193] Los organoides se fijaron durante 4 horas a 4 °C en PFA al 4 % en PBS. Después de la fijación,

las muestras se lavaron 3×30 minutos con PBS y se crioconservaron en sacarosa al 30 % en PBS durante la noche a 4 °C. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Preparación y tinción de criocortes

[0194] Se generaron criocortes (20 – 40 $\mu\text{mol/L}$) utilizando un criostato (MICROM International, n.º HM560) en organoides y retina humana incrustados en compuesto O.C.T. (VWR, n.º 25608–930). Los cortes se montaron en portaobjetos Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific, n.º 10149870), se secaron durante 4 a 16 horas a temperatura ambiente y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Los segmentos externos de los fotorreceptores en los organoides de la retina no se conservaron tras la incrustación en OCT. Por lo tanto, para el criocorte de organoides con segmentos externos de fotorreceptores conservados, los organoides se incrustaron en gelatina al 7,5 % y sacarosa al 10 % en PBS (Lancaster y Knoblich, 2014).

[0195] Para las inmunotinciones de criocortes, los portaobjetos primero se secaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego se rehidrataron durante 5 – 10 minutos en PBS. En segundo lugar, los portaobjetos se bloquearon con un amortiguador de bloqueo que era PBS suplementado con suero de burro normal al 10 % (Sigma, n.º S30–100ML), seroalbúmina bovina al 1 % (peso/vol) (BSA; Sigma, n.º 05482–25G), Triton X-100 al 0,5 % en PBS (Sigma, n.º T9284–500ML) y azida de sodio al 0,02 % (Sigma, n.º S2002–25G) a temperatura ambiente durante 1 h. Luego, los cortes se incubaron en una cámara humidificada con anticuerpos primarios, concretamente anti-GFP de conejo (Invitrogen; 1:200) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-arrestina de conejo humana 7G6 (CAR; Zhang et al., 2003).

[0196] Para cada portaobjetos, los anticuerpos primarios se diluyeron en 100 μL de «amortiguador de bloqueo B» que era PBS suplementado con suero de burro normal al 3 %, BSA al 1 %, Triton X-100 al 0,5 % en PBS y azida de sodio al 0,02 % durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavar 3×15 minutos en PBS con TWEEN 20 al 0,1 % (Sigma, n.º P9416–100ML), los portaobjetos se incubaron con anticuerpos secundarios (Thermo Fisher Scientific, anticuerpos secundarios de burro conjugados con Alexa Fluor 488, 568 o 647) diluidos 1:500 y Hoechst diluido 1:1000 en amortiguador de bloqueo durante dos horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Los cortes se sometieron a lavados de 2×15 minutos en PBS con Tween al 0,1 %, un lavado de 15 minutos en PBS y se cubrieron con ProLong Gold (Thermo Fisher Scientific, n.º P36934). Las imágenes se adquirieron con un microscopio de disco giratorio (sistema de microscopio de disco giratorio confocal IXplore Spin de Olympus).

1.2. Resultados

[0197] Ninguno de los fragmentos con truncamiento en 3' mostró expresión alguna y, por lo tanto, los

fragmentos con truncamiento en 3' no se analizaron más a fondo. La cuantificación de datos de imágenes en vivo de organoides completos mostró que los AAV que impulsan la expresión de GFP bajo el control de ProA7 5'1, 5'2 o 5'3 proporcionaron una cantidad comparable de células que expresaban GFP por pocillo a una densidad similar a la GFP impulsada por ProA7 de longitud completa (FIG. 2). La intensidad media de GFP en las células contadas con GFP+ en los organoides infectados por los truncamientos fue superior a la de los organoides infectados por AAV-ProA7-GFP (FIG. 2-3).

[0198] Para determinar qué tipos de células expresan GFP, los organoides infectados con ProA7 5'3 y 5'4 se procesaron y analizaron más a fondo. La inmunohistoquímica para el marcador específico de los fotorreceptores del cono (arrestina de cono, CAR) y la GFP impulsada por el promotor mostró una fuerte expresión específica del cono en criocortes de organoides por ProA7 5'3. La expresión de GFP fue 98-100 % específica para los fotorreceptores del cono y no se observaron otros tipos de células en las imágenes confocales (analizando al menos 500 células GFP positivas cada una) de organoides infectados con ProA7 5'3 (FIG. 4).

Ejemplo 2. Secuencias promotoras para la expresión específica de genes en fotorreceptores del cono

2.1. Métodos

[0199] Se siguieron los métodos del Ejemplo 1, excepto lo descrito a continuación.

Construcciones y producción de vectores

[0200] Las secuencias de longitud completa y truncadas de 185 bp del promotor específico del cono ProA7 (Jüttner et al., 2019) se fusionaron con el promotor específico del bastón de longitud completa ProA330 (PCT/EP2021/068653) en diferentes órdenes y se insertaron en el plásmido de pAAV antes de la secuencia de Kozak optimizada (GCCACC) y el codón de inicio de la traducción de la secuencia codificante de eGFP, seguido de un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) y un sitio de poliadenilación de SV40 mediante ensamblaje de Gibson. Los vectores se representan esquemáticamente en la FIG. 5.

[0201] Los AAV del serotipo 5 se elaboraron según lo descrito por Grieger et al. (2006). La valoración del número de copias del genoma (GC) se realizó mediante PCR en tiempo real (Applied Biosystems, reactivos TaqMan).

Infección por AAV en organoides de la retina humanos

[0202] Los organoides de la retina se infectaron en la semana 26 con 1E+11 GC/organoide de AAV que portaba nuevas variantes de promotor híbrido (serotipo, AAV5) que inducían la expresión de GFP potenciada.

[0203] Los organoides individuales se colocaron en un único pocillo de una placa de 96 pocillos con fondo en U de fijación ultrabaja (Corning, n.º 7007) y se mantuvieron a 37 °C en CO₂ al 5 % en 100 µL de medio de cultivo que incluía 1E+11 GC AAV. Se añadió medio recientemente preparado y se intercambió como en el Ejemplo 1.

5 *Análisis histológico*

[0204] La densidad de expresión se definió como la densidad porcentual de fotorreceptores del cono marcados en relación con la cantidad total contado de fotorreceptores del cono/mm² en criocortes teñidos con el marcador del cono arrestina de cono (CAR). Todas las secuencias promotoras híbridas probadas impulsaron la expresión en más del 80 % de las células CAR+.

10 [0205] La especificidad de expresión se cuantificó determinando el porcentaje de fotorreceptores del cono en la población general de células GFP+ resaltadas por el AAV. La expresión del fotorreceptor del cono se identificó por la posición de los cuerpos celulares en la capa nuclear externa de la retina y la superposición con la expresión del marcador CAR.

2.2. Resultados

15 [0206] La cuantificación de datos de imágenes en vivo de organoides completos mostró que los AAV que impulsan la expresión de GFP bajo el control de Pro572, Pro573, Pro572.2 o Pro573.2 proporcionaron una cantidad comparable de células que expresaban GFP por pocillo a una densidad similar a la GFP impulsada por ProA7. La intensidad media de GFP en las células contadas con GFP+ en los organoides infectados por AAV-{Pro572/Pro573/Pro572.2/Pro573.2}-GFP fue superior a la de los organoides infectados por AAV-ProA7-GFP (FIG. 6).

20 [0207] Para determinar qué tipos de células expresan GFP, los organoides infectados con AAV-{Pro572/Pro573/Pro572.2/Pro573.2}-GFP se procesaron y analizaron más a fondo.

[0208] La inmunohistoquímica para el marcador de los fotorreceptores del cono (arrestina de cono, CAR) y la GFP impulsada por el promotor mostró una fuerte expresión específica del cono en criocortes de organoides por Pro572, Pro573, Pro572.2 o Pro573.2 (FIG. 7). La comparación cuantitativa de la densidad de expresión de GFP confirmó los datos de imágenes en vivo con más del 85 % del total de fotorreceptores del cono que expresan GFP. Esto es comparable a la densidad de expresión lograda por ProA7 (FIG. 8A).

25 [0209] La expresión de GFP fue 98-100 % específica para los fotorreceptores del cono y no se observaron otros tipos de células en n=10 imágenes confocales (analizando al menos 500 células GFP positivas cada una) de organoides infectados con AAV-Pro572.2-GFP y AAV-Pro573.2-GFP, respectivamente (FIG. 8B).

Ejemplo 3. Eficiencia de los promotores específicos de fotorreceptores del cono híbridos en explantes de retina humana

3.1. Métodos

5 [0210] Se siguieron los métodos del Ejemplo 1, excepto lo descrito a continuación.

Construcciones y producción de vectores

[0211] Las secuencias de longitud completa y truncadas de 185 bp del promotor específico del cono ProA7 (Jüttner et al., 2019) se fusionaron con el promotor específico del bastón de longitud completa ProA330 (WO 2023/280388) en diferentes órdenes y se insertaron en el plásmido de pAAV antes de la
10 secuencia de Kozak optimizada (GCCACC) y el codón de inicio de la traducción de la secuencia codificante de eGFP, seguido de un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) y un sitio de poliadenilación de SV40 mediante ensamblaje de Gibson. Los vectores se representan esquemáticamente en la FIG. 5.

[0212] Los AAV del serotipo 5 y PHP.eB se elaboraron según lo descrito por Grieger et al. (2006). La
15 valoración del número de copias del genoma (GC) se realizó mediante PCR en tiempo real (Applied Biosystems, reactivos TaqMan).

Transducción de AAV en cultivos de retina humana

[0213] Los cultivos de retina humana se mantuvieron a 37 °C en CO₂ al 5 % en medio nutritivo DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific), suplementado con BSA al 0,1 %, clorhidrato de O-acetil-L-carnitina
20 10 µM, ácido fumárico 1 mM, galactosa 0,5 mM, glucosa 1 mM, glicina 0,5 mM, HEPES 10 mM, manosa 0,05 mM, bicarbonato de sodio 13 mM, taurina 3 mM, diclorhidrato de putrescina 0,1 mM, retinol 0,35 µM, acetato de retinilo 0,3 µM, (±)-α-tocoferol 0,2 µM, ácido ascórbico 0,5 mM, selenito de sodio 0,05 µM, hidrocortisona 0,02 µM, progesterona 0,02 µM, insulina 1 µM y 3,3',5'-triyodo-L-tironina 0,003 µM (Sigma-Aldrich). Para los experimentos de transducción de AAV, se utilizaron 20 µL de AAV
25 con valor coincidente (1e11 GC) por explante de retina humana. Los cultivos se mantuvieron durante 5 semanas antes de la fijación y la tinción inmunohistoquímica. Los experimentos se llevaron a cabo en duplicado.

Resultados 3.2.

[0214] Para determinar si los resultados obtenidos en organoides de la retina con promotores híbridos
30 optimizados se traducirían a la retina humana, se transdujo retina humana cultivada con construcciones de vector AAV5 y AAVPHP.eB que expresaban una GFP potenciada (eGFP) bajo el control de los

promotores Pro527.2, Pro573.3, ProSC o ProA7, y se cuantificó la expresión de GFP. Todas las construcciones contenían el elemento WPRE. Las retinas humanas se cultivaron durante 5 semanas antes del análisis histoquímico. Se observó la expresión de GFP con una alta eficacia (más del 95 %) para dirigirse a los fotorreceptores del cono con todas las variantes del promotor híbrido (FIG. 9A). ProSC casi no mostró expresión en los bastones, pero también fue el menos efectivo en los fotorreceptores del cono (FIG. 9B). Las retinas humanas tratadas con AAV5-Pro573.2-EGFP-WPRE mostraron una intensidad media de señal de GFP 3 veces mayor que las tratadas con AAV5-ProSC-EGFP-WPRE (FIG. 9C). Estos resultados parecerían indicar que las construcciones de AAV que contienen los promotores híbridos optimizados en combinación con el elemento WPRE se expresan de manera eficiente y con alta especificidad en los fotorreceptores del cono de la retina independientemente del serotipo de la cápside de AAV, lo que es comparable a lo que se observó en los experimentos de transducción realizados en organoides de la retina humana.

Ejemplo 4. Promotores ProA330 truncados

4.1 Métodos

[0215] Se siguieron los métodos del Ejemplo 1, excepto lo descrito a continuación.

Construcciones y producción de vectores

[0216] Un promotor específico del bastón existente ProA330 (WO 2023/280388) que se sabe que impulsa la expresión de eGFP específicamente en fotorreceptores del bastón, así como fragmentos truncados en 3' y 5' de este, se clonaron cada uno en el plásmido de AAV antes de la secuencia de Kozak optimizada (GCCACC) y el codón de inicio de la traducción de la secuencia codificante de eGFP, seguido de un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). Se cortaron trozos de 105 bp de la secuencia del promotor de bastón ProA330 original (1000 bp) en cualquiera de los extremos para producir fragmentos en 3' 3'1 (895 bp), 3'2 (790 bp), 3'3 (685 bp), y 3'4 (580 bp), 3'5 (475 bp), 3'6 (370 bp), 3'7 (265 bp), 3'8 (160 bp) y 3'9 (55 bp), y fragmentos en 5' 5'1 (895 bp), 5'2 (790 bp), 5'3 (685 bp), y 5'4 (580 bp), 5'5 (475 bp), 5'6 (370 bp), 5'7 (265 bp), 5'8 (160 bp) y 5'9 (55 bp), respectivamente.

[0217] Los vectores virales adenoasociados (AAV) de los serotipos AAV5 y AAVPHP.eB se produjeron en una versión compatible de alto rendimiento del método común de triple transfección descrito por Grieger et al. (2006). Los AAV se utilizaron para transducir organoides de la retina y se analizó la expresión de GFP.

4.2 Resultados

[0218] Los fragmentos truncados en 3' y 5' de Pro330 se clonaron en un plásmido de AAV que expresaba un EGFP, seguido de la producción del vector de AAV y su evaluación en organoides humanos de la retina. Se llevó a cabo la adquisición de imágenes en vivo de organoides de la retina humanos completos de células que expresan GFP después de la transducción con vectores de AAV5 y AAVPHP.eB que contienen cantidades variables de copias del promotor a una dosis de 1E10 y 1E11 genomas virales (v.g) por pocillo. Los vectores evaluados fueron: AAVPHP.eB-ProA7-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-ProSC-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-2xProSC-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-3xProSC-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-4xProSC-EGFP-WPRE, AAV5-ProA330-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-2xmin330-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-3xmin330-EGFP-WPRE, AAVPHP.eB-4xmin330-EGFP-WPRE, AAVPhP.eB-330-3del1del5-EGFP-WPRE y AAVPHP.eB-3del1del6-EGFP-WPRE. Los controles negativos incluyen ningún AAV (Ctrl-noAAV) y AAV5-noPro-EGFP-WPRE (Ctrl-noP).

[0219] La cuantificación de datos de imágenes en vivo de organoides completos mostró que los AAV que impulsan la expresión de GFP bajo el control de Pro330 5'1, 5'2, 5'3, 5'4, 5'5 y 5'6 proporcionaron una cantidad comparable de células que expresaban GFP por pocillo a una densidad similar a la GFP impulsada por Pro330 de longitud completa (Tabla 1). El ProA330 3'1 truncado en 3' también expresó GFP a un nivel comparable al promotor de longitud completa ProA330. Dado que ProA330 5'6 (370 bp) y ProA330 3'1 (895 bp) aún impulsan la expresión de GFP específica del bastón, los resultados parecerían indicar que la región importante de ProA330 que impulsa la expresión específica del cono se encuentra entre los pares de bases 640-895.

Tabla 1.

Promotor	Actividad	Específico al bastón
330 5'1 (895 bp)	Sí	Sí
330 5'2 (790 bp)	Sí	Sí
330 5'3 (685 bp)	Sí	Sí
330 5'4 (580 bp)	Sí	Sí
330 5'5 (475 bp)	Sí	Sí
330 5'6 (370 bp)	Quizás	Sí
330 5'7 (265 bp)	No	No

330 5`8 (160 bp)	No	No
330 5`9 (55 bp)	Sí	No
330 3`1 (895 bp)	Sí	Sí
330 3`2 (790 bp)	Sí	No
330 3`3 (685 bp)	No	NA (no analizado)
330 3`4 (580 bp)	No	NA
330 3`5 (475 bp)	No	NA
330 3`6 (370 bp)	No	NA
330 3`7 (265 bp)	No	NA
330 3`8 (160 bp)	No	NA
330 3`9 (55 bp)	No	NA

Ejemplo 5. Múltiples copias de promotores potencian la expresión génica en los fotorreceptores del cono y bastón

5.1. Métodos

5 [0220] Se siguieron los métodos del Ejemplo 1, excepto lo descrito a continuación.

Construcciones y producción de vectores

[0221] Las réplicas del promotor se diseñaron utilizando Geneious Prime y se ordenaron para la síntesis de genes. Para los promotores específicos del cono, se clonaron réplicas del promotor ProSC 1x, 2x, 3x y 4x en el plásmido pAAV-SynP330-EGFP-WPRE antes de la secuencia de Kozak optimizada (GCCACC) y el codón de inicio de la traducción de la secuencia codificante eGFP, seguido de un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). Para los promotores específicos al bastón, se clonaron 1x, 2x, 3x y 4x_{min330} en el plásmido pAAV-SynP330-EGFP-WPRE antes de la secuencia de Kozak optimizada (GCCACC) y el codón de inicio de la traducción de la secuencia codificante eGFP, seguido de un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). También se clonaron dos mutantes de delección de min330, 330-3del1del5 y 330-3del1del6 en el plásmido pAAV-SynP330-EGFP-WPRE antes de la secuencia de Kozak optimizada (GCCACC) y el codón de inicio de la traducción de la secuencia codificante eGFP, seguido de un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE).

[0222] Los AAV del serotipo 5 y PHP.eB se elaboraron según lo descrito por Grieger et al. (2006). La valoración del número de copias del genoma (GC) se realizó mediante PCR en tiempo real (Applied

Biosystems, reactivos TaqMan).

Transducción de AAV en retinas humanas y organoides de la retina humana

[0223] Los explantes de retina humana y los organoides de la retina humana se transdujeron por triplicado en la semana 28 con un total de 1E10 y 1E11 v.g. por pocillo de lisado celular que contenía AAV mezclado con las variantes del promotor replicado (serotipos, AAV5 y AAVPHP.eB) que inducen la expresión de GFP potenciada.

[0224] Análisis de la expresión de GFP en vivo en organoides completos como se describió anteriormente.

5.2 Resultados

[0225] Para determinar la funcionalidad de incluir múltiples copias de promotores específicos del cono y bastón en la expresión génica, se evaluaron vectores de AAV que contenían réplicas de promotores (2x, 3x, 4x) de los promotores ProSC y min330 que impulsan la expresión de eGFP en cultivos de organoides y se compararon con vectores que contenían una única copia del promotor ProSC o min330. Se cuantificó el análisis de la intensidad de GFP en vivo en los organoides de la retina y se observó una expresión potenciada de GFP después de la transducción con los vectores de AAV que contenían las construcciones promotoras multimerizadas (FIG. 10). La variante 4xProSC sigue siendo específica para los fotorreceptores del cono en la retina humana (FIG. 11A y 11B) y en los organoides de la retina humana (FIG. 12). Estos resultados parecen indicar que múltiples copias de los promotores específicos del cono y bastón, como elementos individuales o en el contexto de un promotor híbrido, pueden potenciar la expresión génica después de la transducción de AAV de la retina humana o de los organoides de la retina humana.

Bibliografía

Jüttner, J., Szabo, A., Gross-Scherf, B., Morikawa, R. K., Rompani, S. B., Hantz, P., & Roska, B. Targeting neuronal and glial cell types with synthetic promoter AAVs in mice, non-human primates and humans. *Nature Neuroscience*, 2019;22(8):1345-1356.

Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1412-28.

Cowan, C. S., Renner, M., De Gennaro, M., Gross-Scherf, B., Goldblum, D., Hou, Y., & Roska, B. Cell types of the human retina and its organoids at single-cell resolution. *Cell* 2020;182(6):1623-1640.

Zhong, X., Gutierrez, C., Xue, T., Hampton, C., Vergara, M.N., Cao, L.-H., Peters, A., Park, T.S., Zambidis, E.T., Meyer, J.S., et al. Generation of three-dimensional retinal tissue with functional

photoreceptors from human iPSCs. Nat. Commun. 2014;5:4047.

Zhang, H. et al. Identification and Light-Dependent Translocation of a Cone-Specific Antigen, Cone Arrestin, Recognized by Monoclonal Antibody 7G6. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44(2003): 2858–2867.

Lancaster, M.A., y Knoblich, J.A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells.

5 Nat. Protoc. 2014;9:2329–2340.

7. LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
1	ProA7	CATCCTGAGAGATGAGCCAGGACAAAGAACCAGTAATAGC TCCTGGAGCAGCACATCTGTTTTGCCAGGATTATCCCTTGGA TCTCTTAAAACCGAGACCTTGTAATCTGAAGACTCAACTTG GGCTGTACCCTTAACCTTCAGCTCTATGATGCAAGTGAGTCC ACAGGACCGGAGGCTTTGAGATGAGCTTTTCAGAAGGGAG GAGTTGGCCGCTTGCTCCCAGAGCTCCAGCACCTGCATTCTT CTGGCTATGTCAGAAGCCAGATCATTTCCTCGTTAAAAAC AAAAACAAAAAAACAAACAAACAAAATGTTAGTCTTTGCC CTTTATCTGCCTGGCAAAGCTTTTAATTGGCTTGATCTGTCA TTCCGCTAGACATAAAGGGGACAATCCCCGGATTAGGAAGG AGCTCTCCAGCTCGGGTAAGGAGTCTCAAGGCAAGGTAGGC AAGCACCACCGGTCCGCACTCTCGCCCAGCTTTTACGGGAA GAAGAGA
2	ProA330	AACCCAAGAAATTACAGGCTGAAACCAGAAAAGAACACAT TAAAGCACCAAGAGAAAGTTGGAGTGGGTGTAAGGGAAAC AGATTTTTTAAAGTTAAGGCTCTGTGAAATGGGTAGAATTAA CTACAGGTTAAAAATAAAATGTTAACTAAAGGTTGCCTCTG AGTAACAGGATTATGGGTGATTTTAATTGTCTTCTTTGTGTA TGTTCAACAGTGACTATAATATGTATTACTTTTGAATAAAG GAAAACCTGAAAGGTGTGTTGTTTTATAAGGGCCCTTAGGT TGCCAAAATTAGAGTCATTGAAATCTAAAGCTGATAAAAAC TTAGTGCAAAGATTGTGACATGGGAGACTACACATACCAG ATCCATAATGTACATGAGGACAGTAGGCCGAGGGGCCCTGC

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		ACATTGAAAGCCACATGGGAGAAGCCCTTGGGAAGGGGA GTGGAAGGATGAGGCAAGGGGCCGGGGGGATGCAGAGGCT GGCAGGCAGTCATTTCTCAGCTTCAGCCATTCCCGCCATGG GGGAATGTGGACAGAGAAGCCAAACAAATCTCCTAAACAG TAAATGTCAGTCTTCTGTGTCAGATATTTAAGAAAATAAC AGAGGTCAGAGAAGACACACCTACAGCAAGTAGACTGTCC CTGTGCTGCCTTTTTGCAACCCCTGCTTTGGCAGTGCTCAAG CCCACCTCCTGCTCTGTGCAGACATCTCTTCTTTGCTCTTACT AGACCAAGGTGAAAGAAAATACTCTCACCTTCTCCCATCTGGC CCCACAGCATCTGGAACACACTGATCCTCATAATCCTTGTTT TTGAGAAATATTAATGACTTAATCTCCCAAGCTTGCTCCCTC TCCTGTGCAGGCCATCTCAGTATGTTTTGCAGACAAGACCC AGAGAAGTCCAGACTGGACTTGTTGCAGACTGCAAACTGC CATTGGAAGGCCTCCGTCCCAGTCCTTCTACAGAGTAGCCA GTGGGATTCCCAGCC
3	Pro572	CATCCTGAGAGATGAGCCAGGACAAAGAACCAGTAATAGC TCCTGGAGCAGCACATCTGTTTTGCCAGGATTATCCCTTGGA TCTCTTAAAACCGAGACCTTGTAATCTGAAGACTCAACTTG GGCTGTACCCTTAACCTTCAGCTCTATGATGCAAGTGAGTCC ACAGGACCGGAGGCTTTGAGATGAGCTTTTCAGAAGGGAG GAGTTGGCCGCTTGCTCCCAGAGCTCCAGCACCTGCATTCTT CTGGCTATGTCAGAAGCCAGATCATTTCCCTCGTTAAAAAC AAAAACAAAAAAACAAACAAACAAAATGTTAGTCTTTGCC CTTTATCTGCCTGGCAAAGCTTTTAATTGGCTTGATCTGTCA TTCCGCTAGACATAAAGGGGACAATCCCCGATTAGGAAGG AGCTCTCCAGCTCGGGTAAGGAGTCTCAAGGCAAGGTAGGC AAGCACCACCGGTCCGCACTCTCGCCCAGCTTTTACGGGAA GAAGAGAAACCAAGAAATTACAGGCTGAAACCAGAAAAG AACACATTAAAGCACCAAGAGAAAGTTGGAGTGGGTTGAA

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGGAAACAGATTTTTAAAGTTAAGGCTCTGTGAAATGGGTA GAATTAACACTACAGGTAAAAATAAAATGTTAACATAAGGTT GCCTCTGAGTAACAGGATTATGGGTGATTTTAATTGTCTTCT TTGTGTATGTTCAACAGTGACTATAATATGTATTACTTTTGG AATAAAGGAAAACCTGAAAGGTGTGTTGTTTTATAAGGGCC CTTAGGTTGCCAAAATTAGAGTCATTGAAATCTAAAGCTGA TAAAAACTTTAGTGCAAAGATTGTGACATGGGAGACTACAC ATACCAGATCCATAATGTACATGAGGACAGTAGGCCGAGG GGCCCTGCACATTGAAAGCCCACATGGGAGAAGCCCTTGGG AAGGGGAGTGGAAGGATGAGGCAAGGGGCCGGGGGGATGC AGAGGCTGGCAGGCAGTCATTTCTCAGCTTCAGCCATTCCC GCCATGGGGGAATGTGGACAGAGAAGCCAAACAAATCTCC TAAACAGTAAATGTCAGTCTTCTGTGTCAGATATTTAAGAA AACTAACAGAGGTCAGAGAAGACACACCTACAGCAAGTAG ACTGTCCCTGTGCTGCCTTTTTGCAACCCCTGCTTTGGCAGT GCTCAAGCCCACCTCCTGCTCTGTGCAGACATCTCTTCTTTG CTCTTACTAGACCAAGGTGAAAGAAAACCTCTCACCTTCTCC CATCTGGCCCCACAGCATCTGGAACACACTGATCCTCATAA TCCTTGTTCTTGAGAAATATTAATGACTTAATCTCCCAAGCT TGCTCCCTCTCCTGTGCAGGCCATCTCAGTATGTTTTGCAGA CAAGACCCAGAGAAGTCCAGACTGGACTTGTTGCAGACTGC AAAACCTGCCATTGGAAGGCCTCCGTCCCAGTCCTTCTACAG AGTAGCCAGTGGGATTCCCAGCC
4	Pro572.2	GTTAGTCTTTGCCCTTTATCTGCCTGGCAAAGCTTTTAATTG GCTTGATCTGTCAATCCGCTAGACATAAAGGGGACAATCCC CGGATTAGGAAGGAGCTCTCCAGCTCGGGTAAGGAGTCTCA AGGCAAGGTAGGCAAGCACCACCGGTCCGCACTCTCGCCCA GCTTTTACGGGAAGAAGAGAAACCCAAGAAATTACAGGCT GAAACCAGAAAAGAACACATTAAAGCACCAAGAGAAAGTT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGAGTGGGTTGAAGGGAAACAGATTTTTAAAGTTAAGGCTC TGTGAAATGGGTAGAATTAACACTACAGGTTAAAAATAAAATG TTAACTAAAGGTTGCCTCTGAGTAACAGGATTATGGGTGAT TTTAATTGTCTTCTTTGTGTATGTTCAACAGTGACTATAATA TGTATTACTTTTGAATAAAAGGAAAACCTGAAAGGTGTGTT GTTTTATAAGGGCCCTTAGGTTGCCAAAATTAGAGTCATTG AAATCTAAAGCTGATAAAAACCTTTAGTGCAAAGATTGTGAC ATGGGAGACTACACATACCAGATCCATAATGTACATGAGGA CAGTAGGCCGAGGGGGCCCTGCACATTGAAAGCCCACATGG GAGAAGCCCTTGGGAAGGGGAGTGGAAGGATGAGGCAAGG GGCCGGGGGGATGCAGAGGCTGGCAGGCAGTCATTTCTCAG CTTCAGCCATTCCCGCCATGGGGGAATGTGGACAGAGAAGC CAAACAAATCTCCTAAACAGTAAATGTCAGTCTTCTGTGTC AGATATTTAAGAAAACCTAACAGAGGTCAGAGAAGACACAC CTACAGCAAGTAGACTGTCCCTGTGCTGCCTTTTTGCAACCC CTGCTTTGGCAGTGCTCAAGCCCACCTCCTGCTCTGTGCAGA CATCTCTTCTTTGCTCTTACTAGACCAAGGTGAAAGAAAAC CTCACCTTCTCCCATCTGGCCCCACAGCATCTGGAACACACT GATCCTCATAATCCTTGTTCTTGAGAAATATTAATGACTTAA TCTCCCAAGCTTGCTCCCTCTCCTGTGCAGGCCATCTCAGTA TGTTTTGCAGACAAGACCCAGAGAAGTCCAGACTGGACTTG TTGCAGACTGCAAAACTGCCATTGGAAGGCCTCCGTCCCAG TCCTTCTACAGAGTAGCCAGTGGGATTCCCAGCC
5	Pro573	AACCCAAGAAATTACAGGCTGAAACCAGAAAAGAACACAT TAAAGCACCAAGAGAAAGTTGGAGTGGGTTGAAGGGAAAC AGATTTTTAAAGTTAAGGCTCTGTGAAATGGGTAGAATTAA CTACAGGTAAAAATAAAATGTAACTAAAGGTTGCCTCTG AGTAACAGGATTATGGGTGATTTTAATTGTCTTCTTTGTGTA TGTTCAACAGTGACTATAATATGTATTACTTTTGAATAAAG

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GAAAACCTGAAAGGTGTGTTGTTTTATAAGGGCCCTTAGGT TGCCAAAATTAGAGTCATTGAAATCTAAAGCTGATAAAAAC TTTAGTGCAAAGATTGTGACATGGGAGACTACACATACCAG ATCCATAATGTACATGAGGACAGTAGGCCGAGGGGCCCTGC ACATTGAAAGCCCACATGGGAGAAGCCCTTGGGAAGGGGA GTGGAAGGATGAGGCAAGGGGCCGGGGGGATGCAGAGGCT GGCAGGCAGTCATTTCTCAGCTTCAGCCATTCCC GCCATGG GGGAATGTGGACAGAGAAGCCAAACAAATCTCCTAAACAG TAAATGTCAGTCTTCTGTGTCAGATATTTAAGAAAATAAC AGAGGTCAGAGAAGACACACCTACAGCAAGTAGACTGTCC CTGTGCTGCCTTTTTGCAACCCCTGCTTTGGCAGTGCTCAAG CCCACCTCCTGCTCTGTGCAGACATCTCTTCTTTGCTCTTACT AGACCAAGGTGAAAGAAAACCTCTCACCTTCTCCCATCTGGC CCCACAGCATCTGGAACACACTGATCCTCATAATCCTTGTTT TTGAGAAATATTAATGACTTAATCTCCCAAGCTTGCTCCCTC TCCTGTGCAGGCCATCTCAGTATGTTTTGCAGACAAGACCC AGAGAAGTCCAGACTGGACTTGTTGCAGACTGCAAAACTGC CATTGGAAGGCCTCCGTCCCAGTCCTTCTACAGAGTAGCCA GTGGGATTCCCAGCCCATCCTGAGAGATGAGCCAGGACAAA GAACCAGTAATAGCTCCTGGAGCAGCACATCTGTTTTGCCA GGATTATCCCTTGATCTCTTAAAACCGAGACCTTGTAATCT GAAGACTCAACTTGGGCTGTACCCTTAACCTTCAGCTCTATG ATGCAAGTGAGTCCACAGGACCGGAGGCTTTGAGATGAGCT TTTCAGAAGGGAGGAGTTGGCCGCTTGCTCCCAGAGCTCCA GCACCTGCATTCTTCTGGCTATGTCAGAAGCCAGATCATTTT CCTCGTTAAAAACAAAAACAAAAAAACAAACAAACAAAAT GTTAGTCTTTGCCCTTTATCTGCCTGGCAAAGCTTTTAATTG GCTTGATCTGTCATTCCGCTAGACATAAAGGGGACAATCCC CGGATTAGGAAGGAGCTCTCCAGCTCGGGTAAGGAGTCTCA

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		AGGCAAGGTAGGCAAGCACCAACCGGTCCGCACTCTCGCCCA GCTTTTACGGGAAGAAGAGA
6	Pro573.2	AACCCAAGAAATTACAGGCTGAAACCAGAAAAGAACACAT TAAAGCACCAAGAGAAAGTTGGAGTGGGTTGAAGGGAAAC AGATTTTTAAAGTTAAGGCTCTGTGAAATGGGTAGAATTAA CTACAGGTAAAAATAAAATGTAACTAAAGGTTGCCTCTG AGTAACAGGATTATGGGTGATTTTAATTGTCTTCTTTGTGTA TGTTCAACAGTGACTATAATATGTATTACTTTTGAATAAAG GAAAACCTGAAAGGTGTGTTGTTTTATAAGGGCCCTTAGGT TGCCAAAATTAGAGTCATTGAAATCTAAAGCTGATAAAAAC TTAGTGCAAAGATTGTGACATGGGAGACTACACATACCAG ATCCATAATGTACATGAGGACAGTAGGCCGAGGGGCCCTGC ACATTGAAAGCCACATGGGAGAAGCCCTTGGGAAGGGGA GTGGAAGGATGAGGCAAGGGGCCGGGGGGATGCAGAGGCT GGCAGGCAGTCATTTCTCAGCTTCAGCCATTCCCGCCATGG GGGAATGTGGACAGAGAAGCCAAACAAATCTCCTAAACAG TAAATGTCAGTCTTCTGTGTCAGATATTTAAGAAAATAAC AGAGGTCAGAGAAGACACACCTACAGCAAGTAGACTGTCC CTGTGCTGCCTTTTTGCAACCCCTGCTTTGGCAGTGCTCAAG CCCACCTCCTGCTCTGTGCAGACATCTCTTCTTTGCTCTTACT AGACCAAGGTGAAAGAAAACCTCACCTTCTCCCATCTGGC CCCACAGCATCTGGAACACACTGATCCTCATAATCCTTG TTC TTGAGAAATATTAATGACTTAATCTCCCAAGCTTGCTCCCTC TCCTGTGCAGGCCATCTCAGTATGTTTTGCAGACAAGACCC AGAGAAGTCCAGACTGGACTTGTTGCAGACTGCAAAACTGC CATTGGAAGGCCTCCGTCCCAGTCCTTCTACAGAGTAGCCA GTGGGATTCCCAGCCGTTAGTCTTTGCCCTTTATCTGCCTGG CAAAGCTTTTAATTGGCTTGATCTGTCATTCCGCTAGACATA AAGGGGACAATCCCCGGATTAGGAAGGAGCTCTCCAGCTCG

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGTAAGGAGTCTCAAGGCAAGGTAGGCAAGCACCACCGGT CCGCACTCTCGCCCAGCTTTTACGGGAAGAAGAGA
7	Elemento de WPRE	GCTTATCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAA GATTGACTGGTATTCTTAACCTATGTTGCTCCTTTTACGCTAT GTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTT CCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTT GCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAAC GTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACT GGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACT TTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCC GCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGG CACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTT TCCTTGGCTGCTCGCCTATGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGG GACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGA CCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCC GCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTG GGCCGCCTCCCCGCATCGATACCG
8	Virus de la hepatitis de la marmota con mutación X	AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTG GTATTCTTAACCTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACG CTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGG CTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCT TTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGG TGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGC ATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTC CCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCCTGCCTT GCCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAA TTCCGTGGTGTGTCGGGGAAAGTCTGCTGAGACTCGGGGC TGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCT TCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTC GCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCT CCCCGCCTG
9	PoliA de la hormona de crecimiento humana	ACGGGTGGCATCCCTGTGACCCCTCCCCAGTGCCTCTCCTGG CCCTGGAAGTTGCCACTCCAGTGCCCACCAGCCTTGTCTTA ATAAAATTAAGTTGCATCATTTTGTCTGACTAGGTGTCCTTC TATAATATTATGGGGTGGAGGGGGGTGGTATGGAGCAAGG GGCAAGTTGGGAAGACAACCTGTAGGGCCTGCGGGGTCTAT TGGGAACCAAGCTGGAGTGCAGTGGCACAATCTTGGCTCAC TGCAATCTCCGCCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCTCA GCCTCCCGAGTTGTTGGGATTCCAGGCATGCATGACCAGGC TCAGCTAATTTTTGTTTTTTTGGTAGAGACGGGGTTTCACCA TATTGGCCAGGCTGGTCTCCAACCTAATCTCAGGTGATCT ACCCACCTTGGCCTCCCAAATTGCTGGGATTACAGGCGTGA ACCACTGCTCCCTTCCCTGTCCTT
10	AAV L-ITR	CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCC CGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCG AGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAG GGGTTCTT
11	AAV R-ITR	AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGC GCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCG ACGCCCGGGCTTTGCCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG CGCGCAGCTGCCTGCAGG
12	ProA7 5'1	ATCTGAAGACTCAACTTGGGCTGTACCCTTAACCTTCAGCTC TATGATGCAAGTGAGTCCACAGGACCGGAGGCTTTGAGATG AGCTTTTCAGAAGGGAGGAGTTGGCCGCTTGCTCCCAGAGC TCCAGCACCTGCATTCTTCTGGCTATGTCAGAAGCCAGATC ATTTCCCTCGTTAAAAACAAAAACAAAAAAACAAACAAAC AAAATGTTAGTCTTTGCCCTTTATCTGCCTGGCAAAGCTTTT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		AATTGGCTTGATCTGTCATTCCGCTAGACATAAAGGGGACA ATCCCCGGATTAGGAAGGAGCTCTCCAGCTCGGGTAAGGAG TCTCAAGGCAAGGTAGGCAAGCACCACCGGTCCGCACTCTC GCCCAGCTTTTACGGGAAGAAGAGA
13	ProA7 5'2	GGCCGCTTGCTCCCAGAGCTCCAGCACCTGCATTCTTCTGGC TATGTCAGAAGCCAGATCATTTCCCTCGTTAAAAACAAAA CAAAAAACAAACAAACAAAATGTTAGTCTTTGCCCTTTAT CTGCCTGGCAAAGCTTTTAATTGGCTTGATCTGTCATTCCGC TAGACATAAAGGGGACAATCCCCGGATTAGGAAGGAGCTC TCCAGCTCGGGTAAGGAGTCTCAAGGCAAGGTAGGCAAGC ACCACCGGTCCGCACTCTCGCCCAGCTTTTACGGGAAGAAG AGA
14	ProA7 5'3	GTTAGTCTTTGCCCTTTATCTGCCTGGCAAAGCTTTTAATTG GCTTGATCTGTCATTCCGCTAGACATAAAGGGGACAATCCC CGGATTAGGAAGGAGCTCTCCAGCTCGGGTAAGGAGTCTCA AGGCAAGGTAGGCAAGCACCACCGGTCCGCACTCTCGCCCA GCTTTTACGGGAAGAAGAGA
15	ProA7 5'4	TTAATTGGCTTGATCTGTCATTCCGCTAGACATAAAGGGGA CAATCCCCGGATTAGGAAGGAGCTCTCCAGCTCGGGTAAGG AGTCTCAAGGCAAGGTAGGCAAGCACCACCGGTCCGCACTC TCGCCCAGCTTTTACGGGAAGAAGAGA
16	ProA7 5'5	AGGGGACAATCCCCGGATTAGGAAGGAGCTCTCCAGCTCGG GTAAGGAGTCTCAAGGCAAGGTAGGCAAGCACCACCGGTC CGCACTCTCGCCCAGCTTTTACGGGAAGAAGAGA
17	ProA7 5'6	GCTCGGGTAAGGAGTCTCAAGGCAAGGTAGGCAAGCACCA CCGGTCCGCACTCTCGCCCAGCTTTTACGGGAAGAAGAGA
18	ProA7 3'1	CATCCTGAGAGATGAGCCAGGACAAAGAACCAGTAATAGC TCCTGGAGCAGCACATCTGTTTTGCCAGGATTATCCCTTGGA TCTCTTAAACCGAGACCTTGTAATCTGAAGACTCAACTTG

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GGCTGTACCCTTAACCTTCAGCTCTATGATGCAAGTGAGTCC ACAGGACCGGAGGCTTTGAGATGAGCTTTTCAGAAGGGAG GAGTTGGCCGCTTGCTCCCAGAGCTCCAGCACCTGCATTCTT CTGGCTATGTCAGAAGCCAGATCATTTCCCTCGTTAAAAAC AAAAACAAAAAAACAAACAAACAAAATGTTAGTCTTTGCC CTTTATCTGCCTGGCAAAGCTTTTAATTGGCTTGATCTGTCA TTCCGCTAGACATAAAGGGGACAAT
19	PR1.7	GGAGGCTGAGGGGTGGGGAAAGGGCATGGGTGTTTCATGA GGACAGAGCTTCCGTTTCATGCAATGAAAAGAGTTTGGAGA CGGATGGTGGTGACTGGACTATACACTTACACACGGTAGCG ATGGTACACTTTGTATTATGTATATTTTACCACGATCTTTTT AAAGTGTCAAAGGCAAATGGCCAAATGGTTCCTTGTCCTAT AGCTGTAGCAGCCATCGGCTGTTAGTGACAAAGCCCCTGAG TCAAGATGACAGCAGCCCCCATAACTCCTAATCGGCTCTCC CGCGTGGAGTCATTTAGGAGTAGTCGCATTAGAGACAAGTC CAACATCTAATCTTCCACCCTGGCCAGGGCCCCAGCTGGCA GCGAGGGTGGGAGACTCCGGGCAGAGCAGAGGGCGCTGAC ATTGGGGCCCCGGCCTGGCTTGGGTCCCTCTGGCCTTTCCCCA GGGGCCCTCTTTCCTTGGGGCTTTCTTGGGCCGCCACTGCTC CCGCTCCTCTCCCCCATCCACCCCCTCACCCCCTCGTTCT TCATATCCTTCTCTAGTGCTCCCTCCACTTTCATCCACCCTTC TGCAAGAGTGTGGGACCACAAATGAGTTTTACCTGGCCTG GGGACACACGTGCCCCCACAGGTGCTGAGTGACTTTCTAGG ACAGTAATCTGCTTTAGGCTAAAATGGGACTTGATCTTCTGT TAGCCCTAATCATCAATTAGCAGAGCCGGTGAAGGTGCAGA ACCTACCGCCTTTCCAGGCCTCCTCCACCTCTGCCACCTCC ACTCTCCTTCCTGGGATGTGGGGGCTGGCACACGTGTGGCC CAGGGCATTGGTGGGATTGCACTGAGCTGGGTCATTAGCGT AATCCTGGACAAGGGCAGACAGGGCGAGCGGAGGGGCCAGC

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TCCGGGGCTCAGGCAAGGCTGGGGGCTTCCCCCAGACACCC CACTCCTCCTCTGCTGGACCCCCACTTCATAGGGCACTTCGT GTTCTCAAAGGGCTTCCAAATAGCATGGTGGCCTTGGATGC CCAGGGAAGCCTCAGAGTTGCTTATCTCCCTCTAGACAGAA GGGGAATCTCGGTCAAGAGGGAGAGGTCGCCCTGTTCAAG GCCACCCAGCCAGCTCATGGCGGTAATGGGACAAGGCTGGC CAGCCATCCCACCCTCAGAAGGGACCCGGTGGGGCAGGTG ATCTCAGAGGAGGCTCACTTCTGGGTCTCACATTCTTGGATC CGGTTCCAGGCCTCGGCCCTAAATAGTCTCCCTGGGCTTTCA AGAGAACCACATGAGAAAGGAGGATTCGGGCTCTGAGCAG TTTCACCACCCACCCCCCAGTCTGCAAATCCTGACCCGTGG GTCCACCTGCCCCAAAGGCGGACGCAGGACAGTAGAAGGG AACAGAGAACACATAAACACAGAGAGGGCCACAGCGGCTC CCACAGTCACCGCCACCTTCCTGGCGGGGATGGGTGGGGCG TCTGAGTTTGGTTCCCAGCAAATCCCTCTGAGCCGCCCTTGC GGGCTCGCCTCAGGAGCAGGGGAGCAAGAGGTGGGAGGAG GAGGTCTAAGTCCCAGGCCCAATTAAGAGATCAGGTAGTGT AGGGTTTGGGAGCTTTTAAAGGTGAAGAGGCCCGGGCTGATC CCACAGGCCAGTATAAAGCGCCGTGACCCTCAGGTGATGCG CCAGGGCCGGCTGCCGTCGGGGACAGGGCTTTCCATAGCC
20	hG1.7	TAGGAATAGAAGGGTGGGTGCAGGAGGCTGAGGGGTGGGG AAAGGGCATGGGTGTTTCATGAGGACAGAGCTTCCGTTTCA TGCAATGAAAAGAGTTTGGAGACGGATGGTGGTGACTGGA CTATACACTTACACACGGTAGCGATGGTACACTTTGTATTAT GTATATTTTACCACGATCTTTTTAAAGTGTCAAAGGCCAAATG GCCAAATGGTTCCTTGTCTATAGCTGTAGCAGCCATCGGCT GTTAGTGACAAAGCCCCTGAGTCAAGATGACAGCAGCCCCC ATAACTCCTAATCGGCTCTCCCGCGTGGAGTCATTTAGGAG TAGTCGCATTAGAGACAAGTCCAACATCTAATCTTCCACCC

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TGGCCAGGGCCCCAGCTGGCAGCGAGGGTGGGAGACTCCG GGCAGAGCAGAGGGGCGCTGACATTGGGGCCCCGGCCTGGCTT GGGTCCCTCTGGCCTTTCCCCAGGGGGCCCTCTTTCCTTGGGG CTTTCTTGGGCGCCACTGCTCCCGCTCCTCTCCCCCATCC CACCCCCTCACCCCCTCGTTCTTCATATCCTTCTCTAGTGCTC CCTCCACTTTCATCCACCCTTCTGCAAGAGTGTGGGACCACA AATGAGTTTTTCACCTGGCCTGGGGACACACGTGCCCCCACA GGTGCTGAGTGACTTTCTAGGACAGTAATCTGCTTTAGGCT AAAATGGGACTTGATCTTCTGTTAGCCCTAATCATCAATTAG CAGAGCCGGTGAAGGTGCAGAACCTACCGCCTTTCAGGCC TCCTCCACCTCTGCCACCTCCACTCTCCTTCCTGGGATGTG GGGGCTGGCACACGTGTGGCCCAGGGCATTGGTGGGATTGC ACTGAGCTGGGTCATTAGCGTAATCCTGGACAAGGGCAGAC AGGGCGAGCGGAGGGCCAGCTCCGGGGCTCAGGCAAGGCT GGGGGCTTCCCCCAGACACCCCACTCCTCCTCTGCTGGACC CCCACTTCATAGGGCACTTCGTGTTCTCAAAGGGCTTCCAA ATAGCATGGTGGCCTTGGATGCCCAGGGAAGCCTCAGAGTT GCTTATCTCCCTCTAGACAGAAGGGGAATCTCGGTCAAGAG GGAGAGGTCGCCCTGTTCAAGGCCACCCAGCCAGCTCATGG CGGTAATGGGACAAGGCTGGCCAGCCATCCCACCCTCAGAA GGGACCCGGTGGGGCAGGTGATCTCAGAGGAGGCTCACTTC TGGGTCTCACATTCTTGACAGGTATTTGCCACTAAGCCCAGC TAATTGTTTTTTATTTAGTAGAAACGGGGTTTCACCATGTTA GTCAGGCTGGTCGGGAACCTCCTGACCTCAGGAGATCTACCC GCCTTGGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGCGTGTGCCA CTGTGCCCAGCCACTTTTTTTTAGACAGAGTCTTGGTCTGTT GCCCAGGCTAGAGTTCAGTGGCGCCATCTCAGCTCACTGCA ACCTCCGCCTCCCAGATTCAAGCGATTCTCCTGCCTCGACCT CCCAGTAGCTGGGATTACAGGTTTCCAGCAAATCCCTCTGA

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		GCCGCCCCCGGGGGCTCGCCTCAGGAGCAAGGAAGCAAGG GGTGGGAGGAGGAGGTCTAAGTCCCAGGCCCAATTAAGAG ATCAGATGGTGTAGGATTTGGGAGCTTTTAAGGTGAAGAGG CCCGGGCTGATCCCCTGGCCGGTATAAAGCACCGTGACCC TCAGGTGACGCACCATCTAGAGCTGCCGTCGGGGACAGGGC TTCCATAGCC
21	ProA330 5'1	AAATGGGTAGAATTAACAGGTAAAAATAAAATGTAA CTAAAGGTTGCCTCTGAGTAACAGGATTATGGGTGATTTTA ATTGTCTTCTTTGTGTATGTTCAACAGTGACTATAATATGTA TACTTTTGGAAATAAAGGAAAACCTGAAAGGTGTGTTGTTT TATAAGGGCCCTTAGGTTGCCAAAATTAGAGTCATTGAAAT CTAAAGCTGATAAAAACTTTAGTGCAAAGATTGTGACATGG GAGACTACACATACCAGATCCATAATGTACATGAGGACAGT AGGCCGAGGGGCCCTGCACATTGAAAGCCACATGGGAGA AGCCCTTGGGAAGGGGAGTGGAAGGATGAGGCAAGGGGCC GGGGGGATGCAGAGGCTGGCAGGCAGTCATTTCTCAGCTTC AGCCATTCCCGCCATGGGGGAATGTGGACAGAGAAGCCAA ACAAATCTCCTAAACAGTAAATGTCAGTCTTCTGTGTCAGA TATTTAAGAAAATAACAGAGGTCAGAGAAGACACACCTA CAGCAAGTAGACTGTCCCTGTGCTGCCTTTTTGCAACCCCTG CTTTGGCAGTGCTCAAGCCCACCTCCTGCTCTGTGCAGACAT CTCTTCTTTGCTCTTACTAGACCAAGGTGAAAGAAAACCTC ACCTTCTCCCATCTGGCCCCACAGCATCTGGAACACACTGA TCCTCATAATCCTTGTTCTTGAGAAATATTAATGACTTAATC TCCAAGCTTGCTCCCTCTCCTGTGCAGGCCATCTCAGTATG TTTTGCAGACAAGACCCAGAGAAGTCCAGACTGGACTTGTT GCAGACTGCAAACTGCCATTGGAAGGCCTCCGTCCCAGTC CTTCTACAGAGTAGCCAGTGGGATTCCCAGCC
22	ProA330 5'2	ACAGTGACTATAATATGTATTACTTTTGGAAATAAAGGAAAA

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CCTGAAAGGTGTGTTGTTTTATAAGGGCCCTTAGGTTGCCA AAATTAGAGTCATTGAAATCTAAAGCTGATAAAAACTTTAG TGCAAAGATTGTGACATGGGAGACTACACATAACCAGATCCA TAATGTACATGAGGACAGTAGGCCGAGGGGCCCTGCACATT GAAAGCCCACATGGGAGAAGCCCTTGGGAAGGGGAGTGGA AGGATGAGGCAAGGGGCCGGGGGGATGCAGAGGCTGGCAG GCAGTCATTTCTCAGCTTCAGCCATTCCCGCCATGGGGGAA TGTGGACAGAGAAGCCAAACAAATCTCCTAACAGTAAAT GTCAGTCTTCTGTGTCAGATATTTAAGAAAATAACAGAGG TCAGAGAAGACACACCTACAGCAAGTAGACTGTCCCTGTGC TGCCTTTTTGCAACCCCTGCTTTGGCAGTGCTCAAGCCCACC TCCTGCTCTGTGCAGACATCTCTTCTTTGCTCTTACTAGACC AAGGTGAAAGAAAATACTCTCACCTTCTCCCATCTGGCCCCAC AGCATCTGGAACACACTGATCCTCATAATCCTTGTTCTTGAG AAATATTAATGACTTAATCTCCCAAGCTTGCTCCCTCTCCTG TGCAGGCCATCTCAGTATGTTTTGCAGACAAGACCCAGAGA AGTCCAGACTGGACTTGTTGCAGACTGCAAACTGCCATTG GAAGGCCTCCGTCCCAGTCCTTCTACAGAGTAGCCAGTGGG ATTCCCAGCC
23	ProA330 5'3	AGCTGATAAAAACTTTAGTGCAAAGATTGTGACATGGGAGA CTACACATAACCAGATCCATAATGTACATGAGGACAGTAGGC CGAGGGGCCCTGCACATTGAAAGCCCACATGGGAGAAGCC CTTGGGAAGGGGAGTGGAAGGATGAGGCAAGGGGCCGGGG GGATGCAGAGGCTGGCAGGCAGTCATTTCTCAGCTTCAGCC ATTCCCGCCATGGGGGAATGTGGACAGAGAAGCCAAACAA ATCTCCTAACAGTAAATGTCAGTCTTCTGTGTCAGATATTT AAGAAAATAACAGAGGTCAGAGAAGACACACCTACAGCA AGTAGACTGTCCCTGTGCTGCCTTTTTGCAACCCCTGCTTTG GCAGTGCTCAAGCCCACCTCCTGCTCTGTGCAGACATCTCTT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CTTTGCTCTTACTAGACCAAGGTGAAAGAAAACCTCTCACCT TCTCCCATCTGGCCCCACAGCATCTGGAACACACTGATCCTC ATAATCCTTGTCTTGAGAAATATTAATGACTTAATCTCCCA AGCTTGCTCCCTCTCCTGTGCAGGCCATCTCAGTATGTTTTG CAGACAAGACCCAGAGAAGTCCAGACTGGACTTGTTGCAG ACTGCAAACTGCCATTGGAAGGCCTCCGTCCCAGTCCTTC TACAGAGTAGCCAGTGGGATTCCCAGCC
24	ProA330 5'4	CCCACATGGGAGAAGCCCTTGGGAAGGGGAGTGGAAGGAT GAGGCAAGGGGCCGGGGGGATGCAGAGGCTGGCAGGCAGT CATTTCTCAGCTTCAGCCATTCCCGCCATGGGGGAATGTGG ACAGAGAAGCCAAACAAATCTCCTAAACAGTAAATGTCAGT CTTCTGTGTCAGATATTTAAGAAAATAACAGAGGTCAGAG AAGACACACCTACAGCAAGTAGACTGTCCCTGTGCTGCCTT TTTGCAACCCCTGCTTTGGCAGTGCTCAAGCCCACCTCCTGC TCTGTGCAGACATCTCTTCTTTGCTCTTACTAGACCAAGGTG AAAGAAAACCTCTCACCTTCTCCCATCTGGCCCCACAGCATC TGGAACACACTGATCCTCATAATCCTTGTTCTTGAGAAATAT TAATGACTTAATCTCCCAAGCTTGCTCCCTCTCCTGTGCAGG CCATCTCAGTATGTTTTGCAGACAAGACCCAGAGAAGTCCA GACTGGACTTGTTGCAGACTGCAAACTGCCATTGGAAGGC CTCCGTCCCAGTCCTTCTACAGAGTAGCCAGTGGGATTCCC AGCC
25	ProA330 5'5	CCATGGGGGAATGTGGACAGAGAAGCCAAACAAATCTCCT AAACAGTAAATGTCAGTCTTCTGTGTCAGATATTTAAGAAA ACTAACAGAGGTCAGAGAAGACACACCTACAGCAAGTAGA CTGTCCCTGTGCTGCCTTTTTGCAACCCCTGCTTTGGCAGTG CTCAAGCCCACCTCCTGCTCTGTGCAGACATCTCTTCTTTGC TCTTACTAGACCAAGGTGAAAGAAAACCTCTCACCTTCTCCC ATCTGGCCCCACAGCATCTGGAACACACTGATCCTCATAAT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CCTTGTTCTTGAGAAATATTAATGACTTAATCTCCCAAGCTT GCTCCCTCTCCTGTGCAGGCCATCTCAGTATGTTTTGCAGAC AAGACCCAGAGAAGTCCAGACTGGACTTGTTGCAGACTGCA AAACTGCCATTGGAAGGCCTCCGTCCCAGTCCTTCTACAGA GTAGCCAGTGGGATTCCCAGCC
26	ProA330 5'6	ACCTACAGCAAGTAGACTGTCCCTGTGCTGCCTTTTTGCAAC CCCTGCTTTGGCAGTGCTCAAGCCCACCTCCTGCTCTGTGCA GACATCTCTTCTTTGCTCTTACTAGACCAAGGTGAAAGAAA ACTCTCACCTTCTCCCATCTGGCCCCACAGCATCTGGAACAC ACTGATCCTCATAATCCTTGTTCTTGAGAAATATTAATGACT TAATCTCCCAAGCTTGCTCCCTCTCCTGTGCAGGCCATCTCA GTATGTTTTGCAGACAAGACCCAGAGAAGTCCAGACTGGAC TTGTTGCAGACTGCAAACTGCCATTGGAAGGCCTCCGTCC CAGTCCTTCTACAGAGTAGCCAGTGGGATTCCCAGCC
27	ProA330 5'7	CTAGACCAAGGTGAAAGAAAACCTCTCACCTTCTCCCATCTG GCCCCACAGCATCTGGAACACACTGATCCTCATAATCCTTG TTCTTGAGAAATATTAATGACTTAATCTCCCAAGCTTGCTCC CTCTCCTGTGCAGGCCATCTCAGTATGTTTTGCAGACAAGAC CCAGAGAAGTCCAGACTGGACTTGTTGCAGACTGCAAACT GCCATTGGAAGGCCTCCGTCCCAGTCCTTCTACAGAGTAGC CAGTGGGATTCCCAGCC
28	ProA330 5'8	AATCTCCCAAGCTTGCTCCCTCTCCTGTGCAGGCCATCTCAG TATGTTTTGCAGACAAGACCCAGAGAAGTCCAGACTGGACT TGTTGCAGACTGCAAACTGCCATTGGAAGGCCTCCGTCCC AGTCCTTCTACAGAGTAGCCAGTGGGATTCCCAGCC
29	ProA330 5'9	ATTGGAAGGCCTCCGTCCCAGTCCTTCTACAGAGTAGCCAG TGGGATTCCCAGCC
30	ProA330 3'1	AACCCAAGAAATTACAGGCTGAAACCAGAAAAGAACACAT TAAAGCACCAAGAGAAAAGTTGGAGTGGGTTGAAGGGAAAC

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		AGATTTTTTAAAGTTAAGGCTCTGTGAAATGGGTAGAATTAA CTACAGGTTAAAAATAAAATGTTAATAAGGTTGCCTCTG AGTAACAGGATTATGGGTGATTTTAATTGTCTTCTTTGTGTA TGTTCAACAGTGACTATAATATGTATTACTTTTGAATAAAG GAAAACCTGAAAGGTGTGTTGTTTTATAAGGGCCCTTAGGT TGCCAAAATTAGAGTCATTGAAATCTAAAGCTGATAAAAAC TTAGTGCAAAGATTGTGACATGGGAGACTACACATACCAG ATCCATAATGTACATGAGGACAGTAGGCCGAGGGGCCCTGC ACATTGAAAGCCCACATGGGAGAAGCCCTTGGGAAGGGGA GTGGAAGGATGAGGCAAGGGGCCGGGGGGATGCAGAGGCT GGCAGGCAGTCATTTCTCAGCTTCAGCCATTCCTGCCATGG GGGAATGTGGACAGAGAAGCCAAACAAATCTCCTAAACAG TAAATGTCAGTCTTCTGTGTCAGATATTTAAGAAAATAAC AGAGGTCAGAGAAGACACACCTACAGCAAGTAGACTGTCC CTGTGCTGCCTTTTTGCAACCCCTGCTTTGGCAGTGCTCAAG CCCACCTCCTGCTCTGTGCAGACATCTCTTCTTTGCTCTTACT AGACCAAGGTGAAAGAAAATACTCTCACCTTCTCCCATCTGGC CCCACAGCATCTGGAACACACTGATCCTCATAATCCTTGTTT TTGAGAAATATTAATGACTTAATCTCCCAAGCTTGCTCCCTC TCCTGTGCAGGCCATCTCAGTATGTTTTGCAGA
31	ProA330 3'2	AACCCAAGAAATTACAGGCTGAAACCAGAAAAGAACACAT TAAAGCACCAAGAGAAAGTTGGAGTGGGTTGAAGGGAAAC AGATTTTTTAAAGTTAAGGCTCTGTGAAATGGGTAGAATTAA CTACAGGTTAAAAATAAAATGTTAATAAGGTTGCCTCTG AGTAACAGGATTATGGGTGATTTTAATTGTCTTCTTTGTGTA TGTTCAACAGTGACTATAATATGTATTACTTTTGAATAAAG GAAAACCTGAAAGGTGTGTTGTTTTATAAGGGCCCTTAGGT TGCCAAAATTAGAGTCATTGAAATCTAAAGCTGATAAAAAC TTAGTGCAAAGATTGTGACATGGGAGACTACACATACCAG

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		ATCCATAATGTACATGAGGACAGTAGGCCGAGGGGCCCTGC ACATTGAAAGCCCACATGGGAGAAGCCCTTGGGAAGGGGA GTGGAAGGATGAGGCAAGGGGCCGGGGGGATGCAGAGGCT GGCAGGCAGTCATTTCTCAGCTTCAGCCATTCCCGCCATGG GGGAATGTGGACAGAGAAGCCAAACAAATCTCCTAAACAG TAAATGTCAGTCTTCTGTGTCAGATATTTAAGAAAAC TAAC AGAGGTCAGAGAAGACACACCTACAGCAAGTAGACTGTCC CTGTGCTGCCTTTTTGCAACCCCTGCTTTGGCAGTGCTCAAG CCCACCTCCTGCTCTGTGCAGACATCTCTTCTTTGCTCTTACT AGACCAAGGTGAAAGAAAAC TCTCACCTTCTCCCATCTGGC CCCACAGCATCT
32	ProA330 3'3	AACCCAAGAAATTACAGGCTGAAACCAGAAAAGAACACAT TAAAGCACCAAGAGAAAAGTTGGAGTGGGTTGAAGGGAAAC AGATTTTTTAAAGTTAAGGCTCTGTGAAATGGGTAGAATTAA CTACAGGTAAAAAATAAAATGTTA ACTAAAGGTTGCCTCTG AGTAACAGGATTATGGGTGATTTTAATTGTCTTCTTTGTGTA TGTTCAACAGTGACTATAATATGTATTACTTTTGAATAAAG GAAAACCTGAAAGGTGTGTTGTTTTATAAGGGCCCTTAGGT TGCCAAAATTAGAGTCATTGAAATCTAAAGCTGATAAAAAC TTTAGTGCAAAGATTGTGACATGGGAGACTACACATACCAG ATCCATAATGTACATGAGGACAGTAGGCCGAGGGGCCCTGC ACATTGAAAGCCCACATGGGAGAAGCCCTTGGGAAGGGGA GTGGAAGGATGAGGCAAGGGGCCGGGGGGATGCAGAGGCT GGCAGGCAGTCATTTCTCAGCTTCAGCCATTCCCGCCATGG GGGAATGTGGACAGAGAAGCCAAACAAATCTCCTAAACAG TAAATGTCAGTCTTCTGTGTCAGATATTTAAGAAAAC TAAC AGAGGTCAGAGAAGACACACCTACAGCAAGTAGACTGTCC CTGTGCTGCCTTTTTGCAACCCCTGCTTTGGCA
33	ProA330 3'4	AACCCAAGAAATTACAGGCTGAAACCAGAAAAGAACACAT

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		TAAAGCACCAAGAGAAAAGTTGGAGTGGGTGAAGGGAAAC AGATTTTTAAAGTTAAGGCTCTGTGAAATGGGTAGAATTAA CTACAGGTAAAAATAAAATGTAACTAAAGGTTGCCTCTG AGTAACAGGATTATGGGTGATTTTAATTGTCTTCTTTGTGTA TGTTCAACAGTGACTATAATATGTATTACTTTTGAATAAAG GAAAACCTGAAAGGTGTGTTGTTTTATAAGGGCCCTTAGGT TGCCAAAATTAGAGTCATTGAAATCTAAAGCTGATAAAAAC TTAGTGCAAAGATTGTGACATGGGAGACTACACATACCAG ATCCATAATGTACATGAGGACAGTAGGCCGAGGGGCCCTGC ACATTGAAAGCCCACATGGGAGAAGCCCTTGGGAAGGGGA GTGGAAGGATGAGGCAAGGGGCCGGGGGGATGCAGAGGCT GGCAGGCAGTCATTTCTCAGCTTCAGCCATTCCCGCCATGG GGGAATGTGGACAGAGAAGCCAAACAAATCTCCTAACAG TAAATGTCA
34	ProA330 3'5	AACCCAAGAAATTACAGGCTGAAACCAGAAAAGAACACAT TAAAGCACCAAGAGAAAAGTTGGAGTGGGTGAAGGGAAAC AGATTTTTAAAGTTAAGGCTCTGTGAAATGGGTAGAATTAA CTACAGGTAAAAATAAAATGTAACTAAAGGTTGCCTCTG AGTAACAGGATTATGGGTGATTTTAATTGTCTTCTTTGTGTA TGTTCAACAGTGACTATAATATGTATTACTTTTGAATAAAG GAAAACCTGAAAGGTGTGTTGTTTTATAAGGGCCCTTAGGT TGCCAAAATTAGAGTCATTGAAATCTAAAGCTGATAAAAAC TTAGTGCAAAGATTGTGACATGGGAGACTACACATACCAG ATCCATAATGTACATGAGGACAGTAGGCCGAGGGGCCCTGC ACATTGAAAGCCCACATGGGAGAAGCCCTTGGGAAGGGGA GTGGAAGGATGAGGCAAGGGGCCGG
35	ProA330 3'6	AACCCAAGAAATTACAGGCTGAAACCAGAAAAGAACACAT TAAAGCACCAAGAGAAAAGTTGGAGTGGGTGAAGGGAAAC AGATTTTTAAAGTTAAGGCTCTGTGAAATGGGTAGAATTAA

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CTACAGGTAAAAATAAAATGTAACTAAAGGTTGCCTCTG AGTAACAGGATTATGGGTGATTTTAATTGTCTTCTTTGTGTA TGTTCAACAGTGACTATAATATGTATTACTTTTGAATAAAG GAAAACCTGAAAGGTGTGTTGTTTTATAAGGGCCCTTAGGT TGCCAAAATTAGAGTCATTGAAATCTAAAGCTGATAAAAAC TTAGTGCAAAGATTGTGACATGGGAGACTACACATACCAG A
36	ProA330 3'7	AACCCAAGAAATTACAGGCTGAAACCAGAAAAGAACACAT TAAAGCACCAAGAGAAAAGTTGGAGTGGGTGAAGGGAAAC AGATTTTTAAAGTTAAGGCTCTGTGAAATGGGTAGAATTAA CTACAGGTAAAAATAAAATGTAACTAAAGGTTGCCTCTG AGTAACAGGATTATGGGTGATTTTAATTGTCTTCTTTGTGTA TGTTCAACAGTGACTATAATATGTATTACTTTTGAATAAAG GAAAACCTGAAAGGTGTGT
37	ProA330 3'8	AACCCAAGAAATTACAGGCTGAAACCAGAAAAGAACACAT TAAAGCACCAAGAGAAAAGTTGGAGTGGGTGAAGGGAAAC AGATTTTTAAAGTTAAGGCTCTGTGAAATGGGTAGAATTAA CTACAGGTAAAAATAAAATGTAACTAAAGGTTGCCTC
38	ProA330 3'9	AACCCAAGAAATTACAGGCTGAAACCAGAAAAGAACACAT TAAAGCACCAAGAGA
39	min330	ACCTACAGCAAGTAGACTGTCCCTGTGCTGCCTTTTTGCAAC CCCTGCTTTGGCAGTGCTCAAGCCCACCTCCTGCTCTGTGCA GACATCTTCTTTGCTCTTACTAGACCAAGGTGAAAGAAA ACTCTCACCTTCTCCCATCTGGCCCCACAGCATCTGGAACAC ACTGATCCTCATAATCCTTGTTCTTGAGAAATATTAATGACT TAATCTCCCAAGCTTGCTCCCTCTCCTGTGCAGGCCATCTCA GTATGTTTTGCAGA
40	4xProSC	GTTAGTCTTTGCCCTTTATCTGCCTGGCAAAGCTTTTAATTG GCTTGATCTGTCAATCCGCTAGACATAAAGGGGACAATCCC

SEQ ID NO:	Descripción	Secuencia
		CGGATTAGGAAGGAGCTCTCCAGCTCGGGTAAGGAGTCTCA AGGCAAGGTAGGCAAGCACCACCGGTCCGCACTCTCGCCCA GCTTTTACGGGAAGAAGAGAGTTAGTCTTTGCCCTTTATCTG CCTGGCAAAGCTTTTAATTGGCTTGATCTGTCATTCCGCTAG ACATAAAGGGGACAATCCCCGGATTAGGAAGGAGCTCTCC AGCTCGGGTAAGGAGTCTCAAGGCAAGGTAGGCAAGCACC ACCGGTCCGCACTCTCGCCCAGCTTTTACGGGAAGAAGAGA GTTAGTCTTTGCCCTTTATCTGCCTGGCAAAGCTTTTAATTG GCTTGATCTGTCATTCCGCTAGACATAAAGGGGACAATCCC CGGATTAGGAAGGAGCTCTCCAGCTCGGGTAAGGAGTCTCA AGGCAAGGTAGGCAAGCACCACCGGTCCGCACTCTCGCCCA GCTTTTACGGGAAGAAGAGAGTTAGTCTTTGCCCTTTATCTG CCTGGCAAAGCTTTTAATTGGCTTGATCTGTCATTCCGCTAG ACATAAAGGGGACAATCCCCGGATTAGGAAGGAGCTCTCC AGCTCGGGTAAGGAGTCTCAAGGCAAGGTAGGCAAGCACC ACCGGTCCGCACTCTCGCCCAGCTTTTACGGGAAGAAGAGA G