



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 957 840**

⑮ Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2015 E 19186929 (6)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2023 EP 3628334**

⑯ Título: **Tratamiento génico de la retinitis pigmentaria**

⑯ Prioridad:

21.03.2014 US 201461969027 P

⑯ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.01.2024

⑯ Titular/es:

**GENZYME CORPORATION (100.0%)
50 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US**

⑯ Inventor/es:

**O'RIORDAN, CATHERINE y
ADAMOWICZ, MATTHEW**

⑯ Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 957 840 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento génico de la retinitis pigmentaria

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

La presente solicitud reclama el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos con el número de serie 61/969.027, presentada el 21 de marzo de 2014.

10 Listado de secuencias

El contenido de la presentación siguiente en el archivo de texto ASCII es: un formato legible informáticamente (CRF) del Listado de secuencias (nombre del archivo: 159792010040SeqList.txt, fecha registrada: 17 de marzo de 2015, tamaño: 63 KB).

15 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición que comprende vectores AAV y a su uso en procedimientos para el tratamiento de la retinitis pigmentaria y de estrés del retículo endoplásmico (RE).

20 Breve resumen de la invención

La retinitis pigmentaria (RP) es la causa más común de degeneración retiniana hereditaria, que se caracteriza clínicamente por ceguera nocturna y la pérdida de la visión periférica. Las mutaciones en el pigmento visual de bastones rodopsina se reconocen como la causa más común de RP autosómica dominante (ADRP), y aunque se han propuesto y evaluado una serie de tratamientos para la RP por rodopsina en modelos animales y estudios clínicos, la enfermedad continúa siendo incurable (Kalloniatis, M. *et al.* (2004) *Clin. Exp. Optom.* 87 (2): 65-80). Muchos datos respaldan la opinión de que la RP por rodopsina es una enfermedad de plegamiento incorrecto de proteínas en la que el plegamiento incorrecto o el ensamblaje incorrecto de una proteína mutante altera su destino celular e induce la muerte celular (Gregersen, N. *et al.* (2006) *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7: 103-24). Las mutaciones RP conocidas en el gen de la rodopsina incluyen sentido incorrecto y mutaciones de delección en marco cortas, con una única sustitución de base en el codón 23 (P23H) del gen de la rodopsina que representa ~7% de todos los casos de retinitis pigmentaria dominante en Estados Unidos (Dryja, T.P., *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (22): 10177-81). En células cultivadas, la proteína mutante P23H, a diferencia de la proteína de tipo silvestre (WT), se retiene en el RE, lo que conduce a la inducción de la respuesta de proteína desplegada (UPR), la inhibición del proteasoma y la agregación de la proteína mutante en especies oligoméricas de alto peso molecular que forman inclusiones intracelulares (Saliba, R.S., *et al.* (2002) *J. Cell Sci.* 115: 2907-18). De forma similar, la rodopsina P23H se ubica de forma incorrecta y/o se agrega en las células bastón de modelos animales de RP (Olsson, J.E., *et al.* (1992) *Neuron* 9 (5): 815-30), lo que sugiere que los modelos de cultivo celular pueden ser predictivos de modelos *in vivo* de esta enfermedad. Lo que se necesita es un medio para mejorar los síntomas de la RP.

La invención descrita en el presente documento proporciona una composición y una composición para su uso en procedimientos para el tratamiento de la retinitis pigmentaria en un mamífero, comprendiendo la composición una primera partícula vírica de rAAV que comprende un primer vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un miR-708 y una segunda partícula vírica de rAAV que comprende un segundo vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una rodopsina. En algunas formas de realización, el tratamiento de la retinitis pigmentaria comprende reducir o prevenir los síntomas asociados con la retinitis pigmentaria. En algunas formas de realización, el tratamiento de la retinitis pigmentaria incluye reducir un síntoma asociado con RP, prevenir la degeneración retiniana, detener la progresión de la RP, aumentar la función del fotorreceptor, y similares. Los síntomas y/o la patología de la RP incluyen, entre otros, pérdida de visión, pérdida de visión nocturna, pérdida de campos visuales periféricos, pérdida de la función ERG; pérdida de agudeza visual y sensibilidad al contraste; pérdida del comportamiento guiado visualmente, reducción de la función de fotorreceptores de bastones, muerte celular de fotorreceptores de bastones, disminución de la visión escotópica, reducción de cambios en las células de la retina (pérdida de la estructura o la función del fotorreceptor; adelgazamiento o engrosamiento de la capa nuclear externa (ONL); adelgazamiento o engrosamiento de la capa plexiforme externa (OPL); desorganización seguida de pérdida de segmentos externos de bastones y conos; acortamiento de los segmentos internos de bastones y conos; retracción de dendritas de células bipolares; adelgazamiento o engrosamiento de las capas internas de la retina, incluidas la capa nuclear interna, la capa plexiforme interna, la capa de células ganglionares y la capa de fibras nerviosas; ubicación incorrecta de opsina; sobreexpresión de neurofilamentos; y similares. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona la prevención del deterioro de la función de células bastón y la muerte de células bastón y la función de células cono y la muerte de células cono.

En algunos aspectos, la invención proporciona una composición y una composición para su uso en procedimientos para el tratamiento de estrés del retículo endoplásmico (RE) en una célula, comprendiendo la composición un primer vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un miR-708 y una segunda partícula vírica de rAAV que comprende un segundo vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una rodopsina. En algunas formas

de realización, el mamífero padece o está en riesgo de padecer RP. En algunas formas de realización, el mamífero es un ser humano que padece o está en riesgo de padecer RP. En algunas formas de realización, las partículas de rAAV se administran a un ojo del mamífero. En algunas formas de realización, la célula es una célula ocular. En otras formas de realización, la célula es una célula fotorreceptora. En otras formas de realización más, la célula es una célula fotorreceptora bastón. En algunas formas de realización, el tratamiento comprende reducir uno o más marcadores celulares de estrés del RE. En otras formas de realización, los, uno o más, marcadores celulares de estrés del RE son XBP-1, CHOP o Grp78 ayustados.

5

En algunas formas de realización de la invención, el ácido nucleico que codifica miR-708 está operativamente unido a un promotor. En algunas formas de realización, el promotor es capaz de expresar el miR-708 en células fotorreceptoras (por ejemplo una célula fotorreceptora bastón). En otras formas de realización, el promotor comprende un promotor de rodopsina quinasa (RK) o un promotor de opsina. En otras formas de realización de la invención, el ácido nucleico que codifica la rodopsina está operativamente unido a un promotor. En algunas formas de realización, el promotor es capaz de expresar la rodopsina en células fotorreceptoras (por ejemplo una célula fotorreceptora bastón). En otras formas de realización, el promotor comprende un promotor RK o un promotor de opsina.

10

15

En otras formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 está operativamente unido a un primer promotor RK o un primer promotor de opsina y el ácido nucleico que codifica la rodopsina está operativamente unido a un segundo promotor RK o un segundo promotor de opsina. En algunas formas de realización, el primer y/o el segundo promotor de opsina incluyen un intrón MVM (por ejemplo, un intrón de SEQ ID NO: 23). En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 está operativamente unido al promotor de β-actina de pollo (CBA). En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica la rodopsina está operativamente unido al promotor de β-actina de pollo (CBA). En algunas formas de realización, una secuencia derivada de un intrón de virus diminuto de ratón (MVM) se encuentra 3' con respecto al promotor. En algunas formas de realización, el intrón de MMV comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, el promotor comprende además i) un potenciador de CMV; ii) una secuencia derivada de un factor de transcripción específico de fotorreceptores; iii) una secuencia derivada de un factor de transcripción específico de fotorreceptores de bastón; iv) una secuencia derivada de un factor de cremallera básico de la retina neural; v) una secuencia derivada de una secuencia de factor de transcripción que contiene homeobox de conos y bastones; vi) un potenciador de CMV y al menos una o más de una secuencia derivada de un factor de transcripción específico de fotorreceptores de bastón, una secuencia derivada de un factor de transcripción específico de fotorreceptores, una secuencia derivada de un factor de cremallera básico de la retina neural; una secuencia derivada de una secuencia de factor de transcripción que contiene homeobox de conos y bastones; vii) un factor de cremallera de leucina básico de la retina neural, un potenciador de CMV y un promotor de opsina (-500 a +17); viii) un factor de cremallera de leucina básico de la retina neural, un potenciador de CMV, un promotor de opsina (-500 a +17) y un intrón MVM; ix) un potenciador de CMV que comprende la SEQ ID NO: 29; x) una secuencia de factor de cremallera de leucina básico de la retina neural que comprende la SEQ ID NO: 30; xi) una secuencia derivada de una secuencia de factor de transcripción que contiene homeobox de conos y bastones que comprende la SEQ ID NO: 28; xii) un potenciador de CMV que comprende la SEQ ID NO: 29 y al menos una o más de una secuencia derivada de un factor de transcripción específico de fotorreceptor, una secuencia derivada de un factor de transcripción específico de fotorreceptor de bastón, una secuencia derivada de un factor de cremallera básico de la retina neural que comprende la SEQ ID NO: 30; una secuencia derivada de una secuencia de factor de transcripción que contiene homeobox de conos y bastones que comprende la SEQ ID NO: 28; xiii) un factor de cremallera de leucina básico de la retina neural que comprende la SEQ ID NO: 30, un potenciador de CMV que comprende la SEQ ID NO: 29 y un promotor de opsina (-500 a +17) que comprende la SEQ ID NO: 22; o xiv) un factor de cremallera de leucina básico de la retina neural que comprende la SEQ ID NO: 28, un potenciador de CMV que comprende la SEQ ID NO: 29, un promotor de opsina (-500 a +17) que comprende la SEQ ID NO: 22 y un intrón MVM que comprende la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 está integrado en un intrón. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 comprende un andamio miR-708 endógeno o un andamio miR-155.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 comprende el ácido nucleico de SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 comprende un ácido nucleico que tiene aproximadamente al menos el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 1.

En algunas formas de realización, la rodopsina es rodopsina de mamífero o un equivalente funcional de la misma. En algunas formas de realización, la rodopsina es rodopsina humana o un equivalente funcional de la misma. En algunas formas de realización, la rodopsina carece de la secuencia diana miR-708 de la región no traducida (UTR) 3'. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica la rodopsina comprende una sustitución, una inserción o una delección de ácido nucleico en la secuencia diana miR-708. En algunas formas de realización, la sustitución, la inserción o la delección reduce o impide el reconocimiento por miR-708. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica la rodopsina comprende una sustitución, una inserción o una delección de ácido nucleico en la secuencia diana miR-708, siendo la secuencia diana miR-708 la SEQ ID NO: 19. En algunas formas de realización, la expresión de la rodopsina es refractaria a la supresión por miR-708. En algunas formas de realización, la rodopsina comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunas formas de realización, la rodopsina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente al menos el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica la rodopsina comprende ácido nucleico de SEQ ID NO: 3. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica la rodopsina comprende un ácido nucleico que tiene aproximadamente el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3.

5 En algunas formas de realización, la divulgación proporciona una partícula de rAAV que comprende un polinucleótido de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9. En algunas formas de realización, la partícula vírica de AAV comprende un genoma vírico recombinante que comprende un polinucleótido que tiene aproximadamente al menos el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27.

10 15 En algunas formas de realización, la partícula vírica de AAV comprende una cápside de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, un AAV de cabra, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino o rAAV2/HBoV1 de cápside AAV de ratón. En algunas formas de realización, la partícula vírica de rAAV comprende una cápside de serotipo 5 de AAV. En algunas formas de realización, la partícula vírica de rAAV comprende una cápside mutante de tirosina de serotipo 5 de AAV.

20 25 En algunas formas de realización, la primera partícula de rAAV y/o la segunda partícula de virus rAAV comprenden una cápside de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, un AAV de cabra, AAV1/AAV2 quimérico, AAV bovino o rAAV2/HBoV1 de cápside AAV de ratón. En algunas formas de realización, la primera partícula vírica de rAAV y/o la segunda partícula vírica de rAAV comprenden una cápside de serotipo 5 de AAV. En algunas formas de realización, la primera partícula vírica de rAAV y/o la segunda partícula vírica de rAAV comprenden una cápside mutante de tirosina de serotipo 5 de AAV.

30 35 En algunas formas de realización, el vector AAV comprende ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón. En algunas formas de realización, la invención proporciona composiciones para su uso en un procedimiento para el tratamiento de RP y/o el estrés del RE que comprenden administrar a un mamífero una composición que comprende una primera partícula de virus rAAV que comprende un primer vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica miR-708 y una segunda partícula de virus rAAV que comprende un segundo vector rAAV que codifica la rodopsina. En algunas formas de realización, el primer vector rAAV y/o el segundo vector vírico rAAV comprende ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, DJ AAV, un AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón.

40 En algunas formas de realización, los vectores rAAV del procedimiento comprenden ITR de serotipo 2 de AAV. En algunas formas de realización, la ITR y la cápside de la partícula vírica de rAAV se derivan del mismo serotipo AAV. En otras formas de realización, la ITR y la cápside de las partículas víricas de rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV. En algunas formas de realización, la partícula vírica de rAAV comprende una cápside AAV5, y el vector comprende ITR de AAV2. En algunas formas de realización, la partícula vírica de rAAV comprende una cápside mutante de tirosina AAV5, y el vector comprende ITR de AAV2.

45 50 En algunas formas de realización, las partículas de rAAV se inyectan en el espacio subretiniano de la retina del mamífero. En algunas formas de realización, los rAAV se administran en más de una ubicación del espacio subretiniano de la retina del mamífero. En otras formas de realización, las partículas de rAAV se inyectan por vía intravítreal al mamífero. En algunas formas de realización, al menos el 10-30% de las células fotorreceptoras (por ejemplo, las células fotorreceptoras bastón) son transducidas por el AAV.

55 En algunas formas de realización, el mamífero tiene una mutación en el gen de la rodopsina endógena. En algunas formas de realización, la mutación en el gen de la rodopsina endógena es una mutación autosómica dominante. En algunas formas de realización, la retinitis pigmentaria es retinitis pigmentaria autosómica dominante. En algunas formas de realización, el mamífero es un ser humano. En algunas formas de realización, el ser humano tiene una mutación P23H en el gen de la rodopsina endógena.

60 65 En algunas formas de realización, la invención proporciona una composición para su uso en procedimientos de tratamiento de RP y/o el estrés del RE que comprenden administrar a un mamífero la composición que comprende una primera partícula de virus rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica miR-708 y una segunda partícula de virus rAAV que codifica la rodopsina en los que la primera partícula vírica de rAAV que codifica miR-708 y la segunda partícula vírica de rAAV que codifica la rodopsina se administran al mamífero al mismo tiempo. En algunas formas de realización, la primera partícula vírica de rAAV que codifica miR-708 y la partícula vírica de rAAV que codifica la rodopsina se administran al mamífero secuencialmente. En algunas formas de realización, la partícula vírica de rAAV que codifica miR-708 se administra en primer lugar al mamífero y la partícula vírica de rAAV que codifica la rodopsina se administra al mamífero en segundo lugar. En algunas formas de realización, la partícula vírica de rAAV

que codifica la rodopsina se administra al mamífero en primer lugar y la partícula vírica de rAAV que codifica miR-708 se administra al mamífero en segundo lugar.

- 5 En algunas formas de realización de la invención, las partículas víricas de rAAV se encuentran en una composición farmacéutica. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, la invención proporciona una composición que comprende una primera partícula de rAAV que comprende un vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un miR708 y una segunda partícula de rAAV que comprende un vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica la rodopsina para su uso en el tratamiento de la retinitis pigmentaria o para reducir el estrés del RE.
- 10 10 En algunos aspectos, la invención descrita en el presente documento proporciona composiciones para su uso en un procedimiento de tratamiento de la retinitis pigmentaria en un mamífero, comprendiendo las composiciones para el tratamiento de la retinitis pigmentaria una primera partícula vírica de rAAV que comprende un primer vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un miR-708 y una segunda partícula vírica de rAAV que comprende un segundo vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica la rodopsina.
- 15 15 En algunos aspectos, la invención proporciona composiciones para su uso en un procedimiento de tratamiento de estrés del retículo endoplásmico (RE) en una célula, comprendiendo las composiciones una primera partícula vírica de rAAV que comprende un vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un miR-708 y una segunda partícula vírica de rAAV que comprende un segundo vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una rodopsina. En algunas formas de realización, el mamífero con estrés del RE padece o está en riesgo de padecer RP. En algunas formas de realización, el mamífero con estrés del RE es un ser humano que padece o está en riesgo de padecer RP. En algunas formas de realización, la partícula de rAAV se administra a un ojo del mamífero. En algunas formas de realización, la célula es una célula ocular. En otras formas de realización, la célula es una célula fotorreceptora. En otras formas de realización más, la célula es una célula fotorreceptora bastón. En algunas formas de realización, la composición reduce uno o más marcadores celulares de estrés del RE. En otras formas de realización, los, uno o más, marcadores celulares de estrés del RE son XBP-1, CHOP o Grp78 ayustados. En algunas formas de realización, el vector rAAV comprende un ácido nucleico que codifica un miR-708 que además comprende un ácido nucleico que codifica la rodopsina.
- 20 20 En algunas formas de realización de la invención, el ácido nucleico que codifica miR-708 está operativamente unido a un promotor. En algunas formas de realización, el promotor es capaz de expresar el miR-708 en células fotorreceptoras (por ejemplo, células fotorreceptoras bastón). En otras formas de realización, el promotor comprende un promotor de rodopsina quinasa (RK) o un promotor de opsina. En otras formas de realización de la invención, el ácido nucleico que codifica la rodopsina está operativamente unido a un promotor. En algunas formas de realización, el promotor es capaz de expresar la rodopsina en células fotorreceptoras (por ejemplo, células fotorreceptoras bastón). En otras formas de realización, el promotor comprende un promotor RK o un promotor de opsina.
- 25 25 En algunas formas de realización, la invención proporciona composiciones para el tratamiento de RP y/o estrés del RE que comprenden una primera partícula de rAAV que comprende un vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica miR-708 y la rodopsina y una segunda partícula vírica de rAAV que comprende un segundo vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una rodopsina. En otras formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 está operativamente unido a un primer promotor RK o un primer promotor de opsina y el ácido nucleico que codifica la rodopsina está operativamente unido a un segundo promotor RK o un segundo promotor de opsina. En algunas formas de realización, el primer y/o segundo promotor de opsina incluyen un intrón MVM (por ejemplo, un intrón de SEQ ID NO: 23). En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 está operativamente unido al promotor de β-actina de pollo (CBA). En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica la rodopsina está operativamente unido al promotor de β-actina de pollo (CBA). En algunas formas de realización, el primer y/o el segundo promotor de opsina incluye un intrón de MVM (por ejemplo, un intrón de SEQ ID NO: 23). En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 está operativamente unido al promotor de β-actina de pollo (CBA). En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica la rodopsina está operativamente unido al promotor de β-actina de pollo (CBA). En algunas formas de realización, una secuencia derivada de un intrón de virus diminuto de ratón (MVM) se encuentra 3' con respecto al promotor. En algunas formas de realización, el intrón de MMV comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, el promotor comprende además i) un potenciador de CMV; ii) una secuencia derivada de un factor de transcripción específico de fotorreceptores; iii) una secuencia derivada de un factor de transcripción específico de fotorreceptores de bastón; iv) una secuencia derivada de un factor de cremallera básico de la retina neural; v) una secuencia derivada de una secuencia de factor de transcripción que contiene homeobox de conos y bastones; vi) un potenciador de CMV y al menos una o más de una secuencia derivada de un factor de transcripción específico de fotorreceptores, una secuencia derivada de un factor de transcripción específico de fotorreceptores de bastón, una secuencia derivada de un factor de cremallera básico de la retina neural; una secuencia derivada de una secuencia de factor de transcripción que contiene homeobox de conos y bastones; vii) un factor de cremallera de leucina básico de la retina neural, un potenciador de CMV y un promotor de opsina (-500 a +17); viii) un factor de cremallera de leucina básico de la retina neural, un potenciador de CMV, un promotor de opsina (-500 a +17) y un intrón MVM; ix) un potenciador de CMV que comprende la SEQ ID NO: 29; x) una secuencia de factor de cremallera de leucina básico de la retina neural que comprende la SEQ ID NO: 30; xi) una secuencia derivada de una secuencia de factor de

transcripción que contiene homeobox de conos y bastones que comprende la SEQ ID NO: 28; xii) un potenciador de CMV que comprende la SEQ ID NO: 29 y al menos una o más de una secuencia derivada de un factor de transcripción específico de fotorreceptor, una secuencia derivada de un factor de transcripción específico de fotorreceptor de bastón, una secuencia derivada de un factor de cremallera básico de la retina neural que comprende la SEQ ID NO: 30; una secuencia derivada de una secuencia de factor de transcripción que contiene homeobox de conos y bastones que comprende la SEQ ID NO: 28; xiii) un factor de cremallera de leucina básico de la retina neural que comprende la SEQ ID NO: 30, un potenciador de CMV que comprende la SEQ ID NO: 29 y un promotor de opsina (-500 a +17) que comprende la SEQ ID NO: 22; o xiv) un factor de cremallera de leucina básico de la retina neural que comprende la SEQ ID NO: 28, un potenciador de CMV que comprende la SEQ ID NO: 29, un promotor de opsina (-500 a +17) que comprende la SEQ ID NO: 22 y un intrón MVM que comprende la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 está integrado en un intrón. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 comprende un andamio miR-708 endógeno o un andamio miR-155.

En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 comprende el ácido nucleico de SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 comprende un ácido nucleico que tiene aproximadamente al menos el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 1.

En algunas formas de realización, la rodopsina es rodopsina de mamífero o un equivalente funcional de la misma. En algunas formas de realización, la rodopsina es rodopsina humana o un equivalente funcional de la misma. En algunas formas de realización, la rodopsina carece de la secuencia diana miR-708 de la región no traducida (UTR) 3'. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica la rodopsina comprende una sustitución, una inserción o una delección de ácido nucleico en la secuencia diana miR-708. En algunas formas de realización, la sustitución, la inserción o la delección reduce o impide el reconocimiento por miR-708. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica la rodopsina comprende una sustitución, una inserción o una delección de ácido nucleico en la secuencia diana miR-708, siendo la secuencia diana miR-708 la SEQ ID NO: 19. En algunas formas de realización, la expresión de la rodopsina es refractaria a la supresión por miR-708. En algunas formas de realización, la rodopsina comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunas formas de realización, la rodopsina comprende una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente al menos el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 2. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica la rodopsina comprende ácido nucleico de SEQ ID NO: 3. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica la rodopsina comprende un ácido nucleico que tiene aproximadamente el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 3.

En algunas formas de realización, la partícula de rAAV comprende un polinucleótido de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9. En algunas formas de realización, la partícula vírica de AAV comprende un genoma vírico recombinante que comprende un polinucleótido que tiene aproximadamente al menos el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 27.

En algunas formas de realización, la partícula vírica de AAV comprende una cápside de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, un AAV de cabra, AAV1/AAV2 químérico, AAV bovino o rAAV2/HBoV1 de cápside AAV de ratón. En algunas formas de realización, la partícula vírica de rAAV comprende una cápside de serotipo 5 de AAV. En algunas formas de realización, la partícula vírica de rAAV comprende una cápside mutante de tirosina de serotipo 5 de AAV.

En algunas formas de realización, la invención proporciona composiciones para su uso en un procedimiento de tratamiento de RP y/o el estrés del RE que comprenden una primera partícula de virus rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica miR-708 y una segunda partícula de virus rAAV que codifica la rodopsina. En algunas formas de realización, la primera partícula de rAAV y/o la segunda partícula de virus rAAV comprenden una cápside de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, un AAV de cabra, AAV1/AAV2 químérico, AAV bovino o rAAV2/HBoV1 de cápside AAV de ratón. En algunas formas de realización, la primera partícula vírica de rAAV y/o la segunda partícula vírica de rAAV comprenden una cápside de serotipo 5 de AAV. En algunas formas de realización, la primera partícula vírica de rAAV y/o la segunda partícula vírica de rAAV comprenden una cápside mutante de tirosina de serotipo 5 de AAV.

En algunas formas de realización, la invención proporciona composiciones para el tratamiento de RP y/o el estrés del RE que comprenden una partícula de rAAV en la que el vector AAV comprende un ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón. En algunas formas de realización, la invención proporciona composiciones para el tratamiento de RP y/o el estrés del RE que comprenden una primera partícula de virus rAAV que comprende un primer vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica miR-708 y una segunda partícula de virus rAAV que comprende un segundo vector rAAV que codifica la rodopsina. En algunas formas de realización, el primer vector rAAV y/o el segundo vector vírico rAAV comprenden un ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4,

AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón.

5 En algunas formas de realización de la invención, los vectores rAAV de la composición comprenden ITR de serotipo 2 de AAV. En algunas formas de realización, la ITR y la cápside de la partícula vírica de rAAV se derivan del mismo serotipo AAV. En otras formas de realización, la ITR y la cápside de las partículas víricas de rAAV se derivan de diferentes serotipos de AAV. En algunas formas de realización, la partícula vírica de rAAV comprende una cápside AAV5, y el vector comprende ITR de AAV2. En algunas formas de realización, la partícula vírica de rAAV comprende una cápside mutante de tirosina AAV5, y el vector comprende ITR de AAV2.

10 En algunas formas de realización, la invención proporciona composiciones para su uso en un procedimiento de tratamiento de RP y/o el estrés del RE en un mamífero, en las que el mamífero tiene una mutación en el gen de la rodopsina endógena. En algunas formas de realización, la mutación en el gen de la rodopsina endógena es una mutación autosómica dominante. En algunas formas de realización, la retinitis pigmentaria es retinitis pigmentaria autosómica dominante. En algunas formas de realización, el mamífero es un ser humano. En algunas formas de realización, el ser humano tiene una mutación P23H en el gen de la rodopsina endógena.

15 En algunas formas de realización, la invención proporciona kits para el tratamiento de RP o para reducir el estrés del RE en un mamífero que comprende una cantidad eficaz de partículas de rAAV que comprenden un vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica miR-708. En algunas formas de realización, el kit comprende una cantidad eficaz de partículas de rAAV que comprenden un vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica miR-708 y la rodopsina. En algunas formas de realización, el kit comprende una cantidad eficaz de primeras partículas de rAAV que comprenden un vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica miR-708 y una cantidad eficaz de segundas partículas de rAAV que comprenden un segundo vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica la rodopsina. En otras formas de realización, el kit comprende instrucciones para el uso de las partículas de rAAV en el tratamiento de la retinitis pigmentaria y/o la reducción de estrés del RE. En otras formas de realización, el kit comprende instrucciones para su uso tal como se describe en el presente documento.

20 En algunos aspectos, la divulgación proporciona un ácido nucleico que comprende un intrón derivado de un MVM. En algunas formas de realización, el intrón MVM comprende la SEQ ID NO: 23. En algunas formas de realización, el ácido nucleico comprende además un promotor. En algunas formas de realización, el promotor está ubicado 5' con respecto al intrón MVM. En algunas formas de realización, la invención proporciona un constructo de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5, 6, 7, 24, 25, 26 o 27.

25 Breve descripción de los dibujos

30 Las figuras 1A y 1B muestran la ubicación de rodopsina de tipo silvestre (figura 1A) y mutante P23H (figura 1B) en células epiteliales pigmentadas retinianas humanas. Las células se tiñen para rodopsina (verde), α -tubulina (rojo) y ADN (azul). El patrón de tinción de la rodopsina de tipo silvestre es característico de la ubicación en membrana (flecha continua), mientras que el patrón de tinción de la rodopsina mutante P23H es característico de la ubicación perinuclear/reticular (flecha discontinua).

35 Las figuras 2A y 2B muestran que la rodopsina mutante P23H forma oligómeros no nativos y retiene oligosacáridos específicos del RE. (Figura 2A) Inmunotransferencia Western de extractos solubles en detergente de células que expresan rodopsina de tipo silvestre ("wt") o mutante P23H. (Figura 2B) Inmunotransferencia Western de extractos solubles en detergente de células que expresan rodopsina de tipo silvestre ("wt") o mutante P23H. Los extractos se trataron con endoglicosidasa H ("Endo-H") o se dejaron sin tratar.

40 Las figuras 3A y 3B muestran que las células que expresan rodopsina P23H tienen una mayor expresión de marcadores UPR y una mayor propensión a la apoptosis. (Figura 3A) Expresión relativa de la proteína homóloga C/EBP (CHOP; también denominada *Ddit3*), que se une a la proteína de inmunoglobulina (BiP; también denominada *Hspa5*) y genes de rodopsina en células que expresan rodopsina de tipo silvestre ("wt") o mutante P23H. La expresión relativa de cada gen se comparó con la expresión de beta-glucuronidasa utilizando el procedimiento $\Delta\Delta Ct$. (Figura 3B) Porcentaje de células apoptóticas en células que expresan el control (pcDNA), la rodopsina de tipo silvestre o la rodopsina mutante P23H, medido por tinción con TUNEL.

45 La figura 4 muestra un diagrama de la construcción de un vector de expresión para expresar miR-708 bajo el control de un promotor ubicuo (β -actina de pollo, CBA) o un promotor específico de fotorreceptores (rodopsina quinasa, RK). El ADN que codifica las secuencias de tallo y bucle de miR-708 se sintetizó y se clonó entre la secuencia de andamio miR-155 5' y 3'. Esta secuencia de andamio contiene los sitios diana requeridos por Drosha para procesar pri-miR-708 en pre-miR-708 en el núcleo, permitiendo el procesamiento posterior de pre-miR-708 por Dicer en el citoplasma.

50 La figura 5 muestra la expresión de la proteína rodopsina en células que expresan miR-708 o un miARN de control, con respecto a células no transfectadas. Todas las células son células HEK-293 que expresan la rodopsina mP23H que tiene una secuencia diana de miR708 UTR 3'. La expresión de la proteína rodopsina se normaliza a la expresión

de hGAPDH. Los niveles de proteína rodopsina disminuyen en presencia de miR708 en comparación con el miR de control.

5 La figura 6 muestra que las células HEK-293 que expresan la rodopsina mP23H tienen niveles de ARN reducidos de los genes marcadores de UPR CHOP y BiP tras la expresión de miR-708, en comparación con las células que expresan un miARN de control ("Scramble").

10 Las figuras 7A y 7B muestran que la regulación a la baja de la rodopsina por miR-708 endógeno depende de la presencia de una secuencia diana de miR-708 en la UTR 3' de rodopsina. Se transfecaron células HEK-293 con un gen de rodopsina P23H de ratón que incluye la secuencia diana de miR-708 (figura 7A), o con un gen de rodopsina P23H humano que carece de la secuencia diana de miR-708 (figura 7B). Las células también se transfecaron con un pre-miARN de control o un pre-miARN anti-miR-708 para inhibir miR-708 endógeno. La proteína rodopsina se midió con respecto a la proteína hGAPDH, y el ARNm de rodopsina se midió con respecto al ARNm de hGAPDH. También se muestran los niveles de miR-708 endógeno (eje derecho y dos columnas más a la derecha en las figuras 7A y 7B).

15 15 La figura 8 representa un diagrama de un vector AAV para expresar miR-708 en fotorreceptores de bastón. Las características relevantes del vector están etiquetadas.

20 Las figuras 9A y 9B muestran que la expresión de miR-708 utilizando un vector AAV regula a la baja la rodopsina mutante P23H. (Figura 9A) Expresión de miR-708 en células WERI o RPE tras la transfección de un vector que codifica miR-708 dirigido por el promotor RK o un miARN de control ("Scramble"). La expresión se representa con respecto a la expresión de miR-16. (Figura 9B) Expresión del ARNm de rodopsina P23H en células WERI transfecadas con un plásmido pRK-miR-708, con respecto a células transfecadas con un plásmido de control.

25 Las figuras 10A-10C muestran que la administración subretiniana de un vector AAV5 miR-708 da como resultado la atenuación de la rodopsina de ratón. (Figura 10A) Expresión de m-rodopsina en retinas de ratón a las que se inyectó AAV5 miR-708 o AAV5 miR-Control. (Figura 10B) Expresión de RdCVF en retinas de ratón a las que se inyectó AAV5 miR-708 o AAV5 miR-Control. (Figura 10C) Expresión de miR-708 en retinas de ratón a las que se inyectó AAV5 miR-708 o AAV5 miR-Control.

30 30 Las figuras 11A y 11B muestran que el tratamiento de los ojos con AAV5 miR-708 reduce las respuestas mediadas por bastones, pero no por conos. (Figura 11A) Tres electrorretinogramas representativos que representan respuestas escotópicas en ojos que recibieron AAV5 miR-708 o AAV5 miR-Control ("Scram"). (Figura 11B) Tres electrorretinogramas representativos que representan respuestas fotópicas en los mismos ojos que en la figura 11A que recibieron AAV5 miR-708 o AAV5 miR-Control ("Scram").

35 La figura 12 proporciona un diagrama del vector de supresión/reemplazo de h-rodopsina (rodopsina humana, hRho) integrada en intrón miR-708.

40 40 La figura 13 muestra que un vector miR-708 integrado en intrón reduce la expresión de m-rodopsina (rodopsina de ratón), hCHOP (CHOP humano) y hBiP (BiP humano) en células WERI transfecadas con m-rodopsina P23H, en comparación con un vector miR-Control.

45 45 La figura 14 muestra que la expresión de miR-708 a partir del vector integrado en intrón tiene una expresión reducida en comparación con el vector no integrado en células WERI, con la salvedad de que el vector integrado en intrón pRK-hRho-intrón miR-708 también coexpresa h-rodopsina. Todos los vectores que dirigen la expresión de miR-708 utilizando el promotor RK tenían órdenes de magnitud de expresión más baja que un vector que utiliza el promotor CBA.

50 50 La figura 15 muestra que la expresión de h-rodopsina a partir del vector de supresión/reemplazo integrado en intrón es refractaria a la atenuación por miR-708 coexpresado. Los niveles de ARN de h-rodopsina son los mismos en las células transfecadas con vectores que expresan miR-708 o miR-Control.

55 55 La figura 16 muestra que el vector de supresión/reemplazo de miR-708 reduce el ayuste de XBP-1, un marcador de estrés del RE, en células WERI que expresan rodopsina mutante. Esta reducción se observa solo si la secuencia diana de miR-708 UTR 3' está presente en el tránscribo de rodopsina.

60 60 La figura 17 muestra un diagrama de un vector con el andamio de intrón de β -globina humana miR-708 en la UTR 3' del ADNc de rodopsina.

65 65 La figura 18 muestra que un vector con el andamio de intrón de β -globina humana miR-708 en la UTR 3' del ADNc de rodopsina produce una mayor expresión de h-rodopsina y miR-708 que un vector con el andamio en la UTR 5'.

65 La figura 19 muestra un diagrama de un diseño de vector alternativo utilizando promotores separados para dirigir la expresión de miR-708 (promotor RK) y h-rodopsina (promotor de opsina de ratón).

La figura 20 muestra la expresión de h-rodopsina (izquierda) y miR-708 (derecha) en células WERI transfectadas con el vector especificado. La expresión se expresa como número de copias calculado frente a un patrón de ADN.

- 5 Las figuras 21A-C muestran los niveles de miR-708 (figura 21A), rodopsina de ratón (figura 21B) y rodopsina humana (figura 21C) en retinas de ratón tres semanas después de la inyección por vía subretiniana con un vector de cápside AAV5 que dirige la expresión de rodopsina humana y miR-708 (miR 708/708), o rodopsina humana y miARN de control (miR-Cont), en un andamio miR-708 utilizando promotor de opsina. Para cada experimento, la expresión se muestra como veces de expresión, en comparación con el ojo no inyectado contralateral.
- 10 La figura 22 muestra un esquema del constructo del promotor de opsina, que incluye la secuencia del factor de cremallera básico de la retina neural (NRL), el potenciador de CMV, el promotor de opsina y la secuencia de intrón MVM, que incluye una secuencia de intrón híbrida del exón 1 de CBA y un intrón del virus diminuto de ratones (MVM).
- 15 La figura 23A muestra un esquema de la secuencia de miR-708 integrada en un intrón de beta-globina.
- 20 Las figuras 23B y 23C muestran esquemas de la secuencia de miR-708 en el contexto de cualquiera del andamio miR-708 endógeno (figura 23B) o el andamio miR-155 (figura 23C), integrado en un intrón de beta-globina. La "secuencia de bucle" de miR-155 entre las secuencias flanqueantes miR 5' y 3' está marcada en la figura 23C.
- 25 La figura 24 muestra la evaluación de vectores candidatos que albergan la secuencia miR-708, ya sea en el andamio miR-155 o en el miR-708 (integrado en el intrón de beta-globina), y la secuencia codificadora de rodopsina humana (h-rodopsina; también carece de una secuencia diana de miR-708 UTR 3') dirigida por el promotor de rodopsina quinasa (GRK1) o el promotor de opsina (Ops). Las cuatro combinaciones se sometieron a ensayo para determinar los efectos sobre la expresión de miR-708 y de h-rodopsin, tal como se muestra.

Descripción detallada

- 30 La presente invención proporciona una composición y su uso en procedimientos para el tratamiento de retinitis pigmentaria (RP) en un mamífero que comprenden administrar al ojo del mamífero una primera partícula vírica de virus recombinante adenoasociado (rAAV) que comprende un vector que codifica un miR-708 y una segunda rodopsina y una segunda partícula vírica de rAAV que comprende un segundo vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una rodopsina. El miR-708 se dirige a una región en la región no traducida 3' del gen de la rodopsina y, como tal, puede suprimir la actividad de una rodopsina mutante asociada con RP. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica la rodopsina de tipo silvestre no incluye la diana de miR-708 UTR 3' de forma que el miR-708 solo se dirigirá a la expresión de la rodopsina mutante. La invención proporciona composiciones que comprenden partículas de rAAV que codifican miR-708 y partículas de rAAV que codifican la rodopsina.

I. Técnicas generales

- 40 Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados en el presente documento generalmente se entienden claramente y se emplean de forma habitual utilizando metodología convencional por parte de los expertos en la técnica, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 4^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al.* eds., 2003); la serie *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds., 1995); *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow y Lane, eds., 1988); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6^a ed., J. Wiley and Sons, 2010); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather y P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths y D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1996); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis *et al.*, eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., J. Wiley and Sons, 2002); *Immunobiology* (C.A. Janeway *et al.*, 2004); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 2011).

60 II Definiciones

- Un "vector", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un plásmido o un virus recombinante que comprende un ácido nucleico que se va a introducir en una célula huésped, tanto *in vitro* como *in vivo*.
- 65 El término "polinucleótido" o la expresión "ácido nucleico", tal como se utilizan en el presente documento, se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por lo

tanto, dicho término y dicha expresión incluyen, entre otros, ADN o ARN monocatenarios, bicatenarios o multicatenarios, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases nucleótidas naturales, químicamente o bioquímicamente modificadas, no naturales o derivatizadas. El esqueleto del polinucleótido puede comprender azúcares y grupos fosfato (tal como se pueden encontrar típicamente en ARN o ADN), o grupos azúcar o fosfato modificados o sustituidos. Alternativamente, el esqueleto del polinucleótido puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamidatos y, por lo tanto, puede ser un fosforamidato de oligodesoxinucleósido (P-NH₂) o un oligómero mixto de fosforamidato-fosfodiéster. Además, se puede obtener un polinucleótido bicatenario a partir del producto polinucleotídico monocatenario de síntesis química sintetizando la cadena complementaria e hibridando las cadenas en condiciones apropiadas, o sintetizando la cadena complementaria *de novo* utilizando una ADN polimerasa con un cebador apropiado.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se utilizan indistintamente para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos, y no están limitados a una longitud mínima. Dichos polímeros de residuos de aminoácidos pueden contener residuos de aminoácidos naturales o no naturales, e incluyen, pero sin limitación, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros y multímeros de residuos de aminoácidos. Tanto las proteínas de longitud completa como sus fragmentos están abarcados por la definición. Los términos también incluyen modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilación, sialilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los fines de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora), en la secuencia nativa, siempre que la proteína conserve la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como a través de mutaciones de huéspedes que producen las proteínas o errores debidos a la amplificación por PCR.

25 Un "vector vírico recombinante" se refiere a un vector polinucleotídico recombinante que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencias de ácido nucleico que no son de origen vírico). En el caso de vectores AAV recombinantes, el ácido nucleico recombinante está flanqueado por al menos una, preferentemente dos, secuencias de repetición terminal invertida (ITR).

30 Un "vector AAV recombinante (vector rAAV)" se refiere a un vector polinucleotídico que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencias de ácidos nucleicos que no son de origen AAV) que están flanqueadas por al menos una, preferentemente dos, secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV. Dichos vectores rAAV pueden replicarse y empaquetarse en partículas víricas infecciosas cuando están presentes en una célula huésped que ha sido infectada con un virus auxiliar adecuado (o que expresa funciones auxiliares adecuadas) y que expresa productos de genes rep y cap de AAV (es decir proteínas Rep y Cap de AAV). Cuando se incorpora un vector rAAV en un polinucleótido más grande (por ejemplo en un cromosoma o en otro vector, tal como un plásmido utilizado para la clonación o la transfección), entonces el vector rAAV puede denominarse un "pro-vector" que puede "rescatarse" mediante replicación y encapsidación en presencia de funciones de empaquetamiento de AAV y funciones auxiliares adecuadas. Un vector rAAV puede encontrarse en cualquiera de una diversidad de formas, incluidas, pero sin limitación, plásmidos, cromosomas artificiales lineales, complejados con lípidos, encapsidados en liposomas y, de la forma más preferida, encapsidados en una partícula vírica, particularmente una partícula de AAV. Un vector rAAV se puede empaquetar en una cápside de virus AAV para generar una "partícula vírica adenoasociada recombinante (partícula de rAAV)".

45 "Heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se compara o en la que se introduce o se incorpora. Por ejemplo, un polinucleótido introducido por técnicas de ingeniería genética en un tipo celular diferente es un polinucleótido heterólogo (y, cuando se expresa, puede codificar un polipéptido heterólogo). De forma similar, una secuencia celular (por ejemplo un gen o una porción del mismo) que se incorpora en un vector vírico es una secuencia de nucleótidos heteróloga con respecto al vector.

50 El término "transgén" se refiere a un polinucleótido que se introduce en una célula y puede transcribirse en ARN y, opcionalmente, traducirse y/o expresarse en condiciones apropiadas. En algunos aspectos, confiere una propiedad deseada a una célula en la que se ha introducido, o de otra forma conduce a un resultado terapéutico o diagnóstico deseado. En otro aspecto, puede transcribirse en una molécula que media la interferencia de ARN, como el ARNip.

55 Las expresiones "partículas del genoma (gp)", "equivalentes del genoma" o "copias del genoma", tal como se utilizan con referencia a un título vírico, se refieren al número de viriones que contienen el genoma de ADN del AAV recombinante, independientemente de su infectividad o su funcionalidad. El número de partículas del genoma en una preparación de vector particular puede medirse mediante procedimientos tales como los descritos en los ejemplos del presente documento, o por ejemplo, por Clark *et al.* (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10: 1031-1039; Veldwijk *et al.* (2002) *Mol. Ther.*, 6: 272-278.

65 Las expresiones "unidad de infección (ui)", "partícula infecciosa" o "unidad de replicación", tal como se utilizan con referencia a un título vírico, se refieren al número de partículas de vector AAV recombinantes infecciosas y competentes en replicación medido mediante el ensayo de centro infeccioso, también conocido como ensayo de centro de replicación, tal como se describe, por ejemplo, por McLaughlin *et al.* (1988) *J. Virol.*, 62: 1963-1973.

- 5 La expresión "unidad de transducción (ut)", tal como se utiliza con referencia a un título vírico, se refiere al número de partículas de vector AAV recombinantes infecciosas que dan como resultado la producción de un producto transgénico funcional medido en ensayos funcionales tal como se describen en los ejemplos en el presente documento, o por ejemplo, por Xiao *et al.* (1997) *Exp. Neurobiol.*, 144: 113-124; o por Fisher *et al.* (1996) *J. Virol.*, 70: 520-532 (Ensayo LFU).
- 10 Una secuencia de "repetición terminal invertida" o "ITR" es una expresión bien entendida en la técnica y se refiere a secuencias relativamente cortas encontradas en los extremos de genomas víricos que se encuentran en orientación opuesta.
- 15 Una secuencia de "repetición terminal invertida (ITR) de AAV", una expresión bien entendida en la técnica, es una secuencia de aproximadamente 145 nucleótidos que está presente en ambos extremos del genoma de AAV monocatenario nativo. Los 125 nucleótidos más externos de la ITR pueden estar presentes en cualquiera de las dos orientaciones alternativas, lo que conduce a heterogeneidad entre diferentes genomas de AAV y entre los dos extremos de un solo genoma de AAV. Los 125 nucleótidos más externos también contienen varias regiones más cortas de autocomplementariedad (designadas regiones A, A', B, B', C, C' y D), lo que permite que se produzca el emparejamiento de bases dentro de la cadena dentro de esta porción de la ITR.
- 20 Una "secuencia de resolución terminal" o "srt" es una secuencia en la región D de la ITR de AAV que es escindida por proteínas rep de AAV durante la replicación del ADN vírico. Una secuencia de resolución terminal mutante es refractaria a la escisión por proteínas rep de AAV.
- 25 Un "virus auxiliar" para AAV se refiere a un virus que permite que el AAV (que es un parvovirus defectuoso) sea replicado y empaquetado por una célula huésped. Se han identificado una serie de estos virus auxiliares, incluidos adenovirus, herpesvirus y poxvirus tales como el virus vacuna. Los adenovirus abarcan un serie de subgrupos diferentes, aunque el Adenovirus tipo 5 del subgrupo C (Ad5) es el que se utiliza más comúnmente. Se conocen numerosos adenovirus de origen humano, no humano de mamíferos y aves y están disponibles en depósitos tales como el ATCC. Los virus de la familia herpes, que también están disponibles en depósitos tales como ATCC, incluyen, por ejemplo, virus del herpes simple (VHS), virus de Epstein-Barr (EBV), citomegalovirus (CMV) y virus de la seudorrabia (PRV).
- 30 El "porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a una secuencia de polipéptido o de ácido nucleico de referencia se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos o nucleótidos en la secuencia de polipéptidos o de ácidos nucleicos de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos se puede lograr de varias formas que son habituales en la técnica, por ejemplo, utilizando programas informáticos disponibles públicamente, por ejemplo, los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, Eds., 1987), Sup. 30, sección 7.7.18, tabla 7.7.1, e incluyen los programas informáticos BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Un programa de alineamiento preferido es ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pensilvania). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluidos los algoritmos necesarios para lograr el alineamiento máximo a lo largo de la longitud total de las secuencias que se comparan. Para los fines de la presente invención, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada, con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que puede expresarse alternativamente como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula de la forma siguiente: 100 veces la fracción X/Y, en la que X es el número de residuos de aminoácidos calificados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias en el alineamiento de ese programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos de aminoácidos de B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. Para los fines de la presente invención, el % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos dada C con respecto a, con o frente a una secuencia de ácidos nucleicos D dada (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de ácidos nucleicos C dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con respecto a, con o frente a una secuencia de ácidos nucleicos D) se calcula de la forma siguiente: 100 veces la fracción W/Z, en la que W es el número de nucleótidos calificado como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencia en el alineamiento de ese programa de C y D, y en la que Z es el número total de nucleótidos de D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de C con respecto a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de D con respecto a C.
- 35 40 45 50 55 60 65 Una molécula (por ejemplo ácido nucleico o proteína) o célula "aislada" significa que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural.

- Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados, incluidos resultados clínicos (por ejemplo, mejora de los síntomas, consecución de puntos finales clínicos y similares). Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. En términos de un estado de enfermedad, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para mejorar, estabilizar o retrasar el desarrollo de una enfermedad.
- Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinadas formas de realización, el individuo o sujeto es un ser humano.
- Tal como se utiliza en el presente documento, "tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de la enfermedad estabilizado (por ejemplo, sin empeoramiento), prevención de la propagación (por ejemplo, metástasis) de la enfermedad, retraso o desaceleración de la progresión de la enfermedad, mejoría o paliación del estado de enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.
- "Retinitis pigmentaria (RP)" se refiere a un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la pérdida progresiva de la vista. Los síntomas generalmente provienen de la degeneración o de anomalías de la retina, que pueden incluir la pérdida de la función de células fotorreceptoras.
- "Rodopsina" se refiere a un miembro de la familia de receptores acoplados a proteína G que opera en la percepción de la luz en las células fotorreceptoras bastón de la retina. Un pigmento visual, la rodopsina contiene un polipéptido opsina unido reversiblemente a su cofactor retiniano. La luz provoca la isomerización de la retina de una forma 11-cis a una forma todo-trans. Esto a su vez provoca un cambio conformacional en el polipéptido que conduce a la activación de la proteína G. Al convertir la presencia de luz en una respuesta bioquímica, la rodopsina posibilita la percepción visual. Su función es necesaria para la visión escotópica (es decir, la visión sin color en luz tenue), y también se cree que es necesaria para la viabilidad de las células fotorreceptoras.
- Tal como se utiliza en el presente documento, "rodopsina" puede referirse al pigmento visual completo incluido en la retina o simplemente al componente o la secuencia de aminoácidos de la molécula. La rodopsina también se puede conocer como OPN2, opsina-2 o RP4. Los ejemplos de proteínas rodopsina pueden incluir, sin limitación, rodopsina humana, de ratón, de perro y de gato, por ejemplo, secuencias de referencia de NCBI NP_000530, NP_663358, NP_001008277 y NP_001009242. Los ejemplos de genes de rodopsina pueden incluir, sin limitación, genes de rodopsina humana, de ratón, de perro y de gato, por ejemplo, GenBank Entrez Gene ID 6010 (*RHO*, también denominado *RP4*, *OPN2* y *CSNBAD1*), GenBank Entrez Gene ID 212541 (*Rho*, también denominado *Ops*, *RP4*, *Opn2* y *Noerg1*), GenBank Entrez Gene ID 493763 y GenBank Entrez Gene ID 493762. El término rodopsina, tal como se utiliza en el presente documento, también incluye equivalentes funcionales de rodopsina (por ejemplo, variantes de rodopsina), que incluyen mutaciones, truncamientos, delecciones y/o inserciones, siempre que el equivalente funcional conserve al menos una parte de la actividad de la rodopsina de tipo silvestre para mejorar los síntomas de la retinitis pigmentaria.
- Tal como se utiliza en el presente documento, "refractario" se refiere a la resistencia a la modulación. Por ejemplo, un gen de rodopsina que es refractario a la supresión por miR-708 es sustancialmente o totalmente resistente a la supresión por miR-708.
- "Promotor de opsina" se refiere a una secuencia de polinucleótidos derivada de un gen de opsina (por ejemplo, opsina de ratón) que dirige la expresión específicamente en las células fotorreceptoras bastón (por ejemplo, células fotorreceptoras bastón). Tal como se utiliza en el presente documento, "promotor de opsina" puede referirse a una secuencia promotora completa o a un fragmento de la secuencia promotora suficiente para dirigir la expresión específica de bastón, tal como las secuencias descritas por Quiambao, A.B., et al. (1997) *Vis. Neurosci.* 14 (4): 617-25 y Le, Y.Z. et al. (2006) *Mol. Vis.* 12: 389-98. En algunas formas de realización, el promotor de opsina contiene un fragmento de 676 pb que codifica un potenciador de CMV de 400 pb aguas arriba de una porción de la secuencia del promotor de opsina (-500 pb - + 15 pb). Además, se incluye una secuencia NRL de 65 pb; esta codifica un factor de cremallera básico de la retina neural (un factor de transcripción específico de fotorreceptores de bastón).
- "Promotor de rodopsina quinasa (RK)" se refiere a una secuencia de polinucleótidos derivada de un gen de rodopsina quinasa (por ejemplo, RK humana, representada por GenBank Entrez Gene ID 6011) que dirige la expresión específicamente en células fotorreceptoras bastón y cono, así como líneas celulares de retina tales como WERI Rb-1. Tal como se utiliza en el presente documento, el "promotor de rodopsina quinasa" puede referirse a una secuencia promotora completa o un fragmento de la secuencia promotora suficiente para dirigir la expresión específica de fotorreceptores, tal como las secuencias descritas por Khani, S.C., et al. (2007) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48 (9): 3954-61 y Young, J.E., et al. (2003) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44 (9): 4076-85. En algunas formas de realización, el promotor RK abarca desde -112 hasta +180 con respecto al sitio de inicio de la transcripción.

"miR-708" se refiere a una secuencia de polinucleótidos de micro-ARN (miARN) que comprende las secuencias de tallo y bucle tal como se muestra en la figura 4. Los ejemplos de polinucleótidos de miR-708 pueden incluir, sin limitación, miR-708 humano, de ratón, de perro y de gato, por ejemplo, tal como se representan por GenBank Entrez Gene ID 100126333, 735284 y 100885899. Los miARN son moléculas pequeñas de ARN no codificantes que regulan la expresión de genes (por ejemplo, por regulación a la baja del tránscrito del gen) que contienen un sitio diana reconocido por el miARN (Bartel, D.P. (2004) *Cell* 116 (2): 281-97). Se sabe que el miR-708 es inducido por CHOP y puede estar involucrado en la regulación de la expresión de rodopsina (Behrman, S. *et al.* (2011) *J. Cell Biol.* 192 (6): 919-27). Tal como se utiliza en el presente documento, "miR-708" puede referirse al polinucleótido miR-708 procesado o a cualquier intermedio en la ruta de procesamiento, por ejemplo, pri-miARN o pre-miARN. Tal como se utiliza en el presente documento, "miR-708" puede referirse a una secuencia de ADN que se transcribe para producir ARN de miR-708, o la secuencia de ARN misma.

La referencia a "aproximadamente" en un valor o parámetro en el presente documento incluye (y describe) formas de realización que se refieren a ese valor o parámetro de por sí. Por ejemplo, la descripción que hace referencia a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

Tal como se utiliza en el presente documento, la forma singular de los artículos "un", "una", "el" y "la" incluye referencias en plural a menos que se indique lo contrario.

III. Retinitis pigmentaria y modelos experimentales de la misma

Tal como se ha descrito anteriormente, la retinitis pigmentaria (RP) se refiere a un grupo de enfermedades oculares degenerativas que pueden causar pérdida progresiva de la vista, incluida pérdida de la visión nocturna, pérdida de los campos visuales periféricos y ceguera total. Se cree que en América la incidencia de RP es aproximadamente de 1 por cada 4.000 personas. La RP a menudo se hereda y se han descrito trastornos autosómicos dominantes, autosómicos recesivos y ligados al cromosoma X. Se han asociado con RP mutaciones en más de 50 genes diferentes, incluidos los componentes involucrados en la cascada de fototransducción, el ciclo retiniano y factores de ayuste, así como más de 100 mutaciones distintas en la rodopsina en sí. En muchos casos, las mutaciones asociadas con RP conducen a la pérdida de la función de fotorreceptores de bastón y/o la muerte celular. Esta pérdida produce una disminución de la visión escotóptica y puede manifestarse como ceguera nocturna o disminución de la visión periférica. La muerte de células bastón también se ha asociado con la muerte posterior de células cono, causando pérdida de visión de alta agudeza, y en combinación con la muerte de células bastón, ceguera.

Se han establecido una diversidad de modelos basados en células y animales para examinar la base celular de RP y para evaluar tratamientos experimentales. Un modelo basado en células para RP son las células epiteliales pigmentadas retinianas humanas (RPE) cultivadas (Adamowicz, M. *et al.* (2012) *Adv. Exp. Biol.* 723: 573-9). Este modelo puede utilizarse para expresar proteínas mutantes implicadas en RP y evaluar el efecto de estas mutaciones en la función de la proteína, o el efecto de las proteínas mutantes en la función y/o la viabilidad celular. Por ejemplo, la rodopsina humana de tipo silvestre y mutante puede expresarse utilizando cualquier promotor apropiado (por ejemplo, CMV). Sin desear vincularse a ninguna teoría, se cree que el plegamiento incorrecto de los polipéptidos de opsina produce retención y estrés en el RE, inducción de la respuesta de proteína desplegada (UPR) y aumento de la muerte celular. Este modelo puede utilizarse para examinar el efecto de cualquier mutación asociada a RP, por ejemplo, una mutación de rodopsina tal como P23H.

Los modelos de RP basados en animales pueden incluir ratones que albergan mutaciones conocidas o sospechosas de causar RP en ratones, o mutaciones ortólogas a las encontradas en humanos. En algunas formas de realización, los modelos de ratón pueden incluir ratones modificados genéticamente para que expresen una rodopsina, por ejemplo, una forma humana o de ratón mutada, en células fotorreceptoras. Los ejemplos de modelos de ratón incluyen el ratón con rodopsina P347S (Li, T. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 (24): 14176-81), el ratón *Rho*^{-/-} (Humphries, M.M., *et al.* (1997) *Nat. Genet.* 15 (2): 216-9) y un ratón que expresa la rodopsina mutante P23H ("ratón P23H") (Olsson, J.E., *et al.* (1992) *Neuron* 9 (5): 815-30). En el ratón P23H, la rodopsina humana mutante puede insertarse en la línea germinal del ratón. Se puede utilizar cualquier promotor conocido en la técnica para la expresión en células fotorreceptoras (por ejemplo, el promotor de opsina de ratón o RK humano). En algunas formas de realización, la rodopsina puede expresarse utilizando un vector AAV.

También se pueden utilizar otros modelos animales para RP. Además de los modelos de ratón, rata, perro, cerdo, rana (Tam, B.M. y Moritz, O.L. (2006) *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (8): 3234-41), y también se pueden utilizar modelos de primates no humanos.

IV. Tratamiento de la retinitis pigmentaria

En algunos aspectos, la invención proporciona composiciones para su uso en procedimientos para el tratamiento de la retinitis pigmentaria en un mamífero que comprende administrar al mamífero (por ejemplo, a la retina) una cantidad eficaz de partículas víricas de rAAV que comprenden un primer vector que codifica un miR-708 y una cantidad eficaz de partículas víricas de rAAV que comprende un segundo vector que codifica una rodopsina. Las composiciones

5 pueden utilizarse para tratar a un ser humano con RP, para mejorar las patologías y el deterioro de la visión asociados con la RP. En algunas formas de realización, la divulgación incluye administrar una cantidad eficaz de partículas víricas de rAAV que comprenden un vector que comprende un ácido nucleico que codifica la rodopsina (por ejemplo, una rodopsina normal o de tipo silvestre). En algunas formas de realización, el miR-708 sirve para suprimir la actividad de una rodopsina mutada asociada con RP. En algunas formas de realización, la rodopsina normal o de tipo silvestre sirve para suplementar al ojo una rodopsina funcional. En algunas formas de realización, la partícula vírica comprende una cápside de serotipo 5 de AAV (cápside AAV5) y repeticiones terminales invertidas de AAV2 o AAV5. En algunas formas de realización, la partícula vírica comprende una cápside mutante de tirosina de serotipo 5 de AAV y repeticiones terminales invertidas de AAV2 o AAV5.

10 10 En algunos aspectos, la divulgación proporciona composiciones para su uso en procedimientos para mejorar un síntoma de RP que comprenden administrar al ojo de un mamífero una cantidad eficaz de partículas víricas de rAAV que comprenden un primer vector que codifica un miR-708 y una cantidad eficaz de partículas víricas de rAAV que comprenden un segundo vector de rAAV que codifica una rodopsina. En algunas formas de realización, los síntomas de RP incluyen, pero sin limitación, ceguera, ceguera nocturna, disminución de la visión periférica y pérdida de visión de alta agudeza. En algunas formas de realización, el tratamiento de la retinitis pigmentaria comprende reducir o prevenir los síntomas asociados con la retinitis pigmentaria, incluyendo, sin limitación, la prevención de la degeneración retiniana, la detención de la progresión de RP, el aumento de la función de fotorreceptores y similares. Los síntomas y/o la patología de RP incluyen, pero sin limitación, pérdida de visión, pérdida de visión nocturna, pérdida de campos visuales periféricos, pérdida de la función ERG; pérdida de agudeza visual y sensibilidad al contraste; pérdida del comportamiento visualmente guiado, reducción de la función de fotorreceptores de bastón, muerte celular de fotorreceptores de bastón, disminución de la visión escotópica, reducción de cambios en las células de la retina (pérdida de la estructura o función de fotorreceptores; adelgazamiento o engrosamiento de la capa nuclear externa (ONL); adelgazamiento o engrosamiento de la capa plexiforme externa (OPL); desorganización seguida de pérdida de los segmentos externos de bastones y conos; acortamiento de los segmentos internos de bastones y conos; retracción de dendritas de células bipolares; adelgazamiento o engrosamiento de las capas internas de la retina, incluida la capa nuclear interna, la capa plexiforme interna, la capa de células ganglionares y la capa de fibras nerviosas; ubicación incorrecta de opsina; sobreexpresión de neurofilamentos; y similares. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona composiciones para su uso en procedimientos para prevenir el deterioro de la función de células bastón y la muerte de células bastón y la función de células cono y la muerte de células cono.

15 30 35 En algunos aspectos, la divulgación proporciona composiciones para su uso en procedimientos para prevenir o retrasar la progresión de la RP. La RP autosómica dominante es una enfermedad genética que puede genotiparse. El inicio y la progresión de la RP pueden determinarse mediante tomografía de coherencia óptica (OCT) que permite examinar anomalías de la capa plexiforme externa (OPL).

20 40 45 Los medios para determinar la mejora de los síntomas de RP son conocidos en la técnica. Por ejemplo, medición de campos visuales (por ejemplo, campos visuales de Goldmann), determinación de electrorretinograma (ERG), fotografías de fondo de ojo, tomografía de coherencia óptica y angiografía con fluoresceína. Las mejoras en el comportamiento evocado visualmente también se pueden utilizar para determinar la mejora de los síntomas de RP; por ejemplo, afirmaciones tales como "puedo encontrar cosas que se caen", "puedo ver caras durante una cena a la luz de las velas", "puedo ver rayas en mi camisa", "puedo ver estrellas en la noche", "puedo leer libros normales y me siento en la parte delantera de la clase", "ahora puedo jugar al fútbol y no necesito a alguien a mi lado que me ayude a encontrar la pelota", "puedo andar en bicicleta por mi vecindario solo", "logré mi sueño: vi a mi hija lanzar un jonrón" y "¿cuándo me pueden inyectar el otro ojo?".

25 50 55 En algunos aspectos, las composiciones se utilizan para el tratamiento de seres humanos con RP. La RP se puede heredar de forma autosómica dominante, autosómica recesiva o ligada al cromosoma X. La RP ligada a X puede ser recesiva, afectando principalmente solo a varones, o dominante, afectando tanto a varones como a mujeres. La RP puede estar provocada por mutaciones en el gen rho que codifica la proteína rodopsina. En algunas formas de realización, las composiciones se utilizan para tratar seres humanos con una mutación en el gen rho y/o en la proteína rodopsina. En algunas formas de realización, la mutación en la proteína rodopsina es una mutación P23H (sustitución de histidina por prolina en el residuo de aminoácido 23 de la proteína rodopsina). En otras formas de realización, la mutación en la proteína rodopsina es una T58R, P347L o P347S, o una delección del residuo 1255. Las mutaciones asociadas con la retinitis pigmentaria se indican por McWilliam, P, *et al.*, (1989) *Genomics* 5: 619-622; Dryja, TP *et al.*, (1990) *Nature* 343: 364-266; Farrar, GJ *et al.*, (1990) *Genomics* 8: 35-40; Farrar, GJ *et al.*, (2002) *EMBO J.* 21: 857-864.

60 65 El miR-708 es un microARN regulado por CHOP que regula la expresión de la rodopsina (Behrman, S. *et al.* (2011) *J. Cell Biol.* 192 (6): 919-27). El miR-708 es un microARN intrónico que reside dentro del gen inducible CHOP Odz4 (*Tenurin-4*). El CHOP regula la expresión de miR-708 durante el estrés del RE. Existe una secuencia putativa de miR-708 en la UTR 3' del gen de la rodopsina que está altamente conservada (véase la figura 4 de Behrman *et al.*, *ibidem*)

70 75 En algunas formas de realización, la invención proporciona composiciones para su uso en procedimientos para tratar a un ser humano con RP. En algunas formas de realización, la invención proporciona composiciones para su uso en procedimientos para tratar a un ser humano con RP autosómica dominante. En algunas formas de realización, la

- invención proporciona composiciones para su uso en procedimientos para tratar a un ser humano con RP asociada con una mutación en el gen de la rodopsina. En algunas formas de realización, la invención proporciona composiciones para su uso en un procedimiento para tratar a un ser humano con RP mediante la administración de una cantidad eficaz de un vector AAV que codifica miR-708 para suprimir la actividad de una rodopsina mutada. En algunas formas de realización, la invención proporciona composiciones para su uso en procedimientos para tratar a un mamífero (por ejemplo, un perro o un gato) con RP. En algunas formas de realización, el ácido nucleico de miR-708 puede incluir, sin limitación, ácido nucleico representado por GenBank Entrez Gene ID 100126333, 735284 o 100885899.
- 5
- La supresión de una rodopsina mutante se complementa con la administración de una cantidad eficaz de vector AAV que codifica una rodopsina de tipo silvestre o una rodopsina con actividad esencialmente igual a la rodopsina de tipo silvestre. En algunas formas de realización, la rodopsina es una rodopsina humana. En algunas formas de realización, la invención proporciona composiciones para su uso en un procedimiento para tratar a un ser humano con RP mediante la administración de una cantidad eficaz de un vector AAV que codifica miR-708 para suprimir la actividad de una rodopsina mutada y una cantidad eficaz de un vector AAV que codifica una rodopsina humana con actividad de tipo silvestre. El vector AAV que codifica miR-708 y el vector AAV que codifica la rodopsina humana son vectores AAV diferentes. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica la rodopsina puede incluir, sin limitación, el ácido nucleico proporcionado por las secuencias de referencia NCBI NP_000530, NP_663358, NP_001008277 y NP_001009242.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- En algunos aspectos, la invención proporciona composiciones para su uso en procedimientos para el tratamiento de estrés del retículo endoplásmico (RE) en una célula que comprenden administrar al mamífero una partícula vírica de rAAV que comprende un primer vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un miR-708 y una partícula de rAAV que comprende un segundo vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una rodopsina. En algunas formas de realización, la célula es una célula ocular. En otras formas de realización, la célula es una célula fotorreceptora. En otras formas de realización más, la célula es una célula fotorreceptora bastón. En algunas formas de realización, el tratamiento comprende reducir uno o más marcadores celulares de estrés del RE. En otras formas de realización, los, uno o más, marcadores celulares de estrés del RE son XBP-1, CHOP o Grp78 ayustados. En otras formas de realización, la invención proporciona composiciones para su uso en procedimientos para el tratamiento de estrés del retículo endoplásmico (RE) en una célula que comprenden administrar al mamífero un primer vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un miR-708 y una segunda partícula vírica de rAAV que comprende un segundo vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica una rodopsina.
- En algunos aspectos, la divulgación proporciona la administración de miR-708 o miR-708 y rodopsina a un mamífero con RP, que comprende administrar a la retina del mamífero una cantidad eficaz de partículas víricas de rAAV que comprenden un vector que codifica miR-708 o la rodopsina. La administración suministra el producto transgénico a las células fotorreceptoras, en las que el miR-708 y la rodopsina median un efecto beneficioso sobre la célula fotorreceptora y las células fotorreceptoras circundantes. En algunas formas de realización, la administración de partículas víricas AAV a la retina se realiza mediante inyección de partículas víricas al espacio subretiniano de la retina. En algunas formas de realización, el suministro de partículas de AAV a la retina es por administración intravítreo siempre que la partícula de AAV sea capaz de penetrar en la parte posterior del ojo y transduzca células fotorreceptoras. En algunas formas de realización, las partículas de AAV se administran en una o más ubicaciones en el espacio subretiniano de la retina.
- En algunas formas de realización, la administración a la retina de una cantidad eficaz de partículas víricas de rAAV que comprenden un vector que codifica miR-708 o la rodopsina transduce células fotorreceptoras en o cerca del sitio de administración. En algunas formas de realización, se transducen más de aproximadamente cualquiera del 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% o 100% de las células fotorreceptoras. En algunas formas de realización se transducen de aproximadamente el 5% a aproximadamente el 100%, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 50%, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 30%, de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 75%, de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 50%, o de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 50% de las células fotorreceptoras. En la técnica se conocen procedimientos para identificar células fotorreceptoras transducidas por AAV que expresan miR-708 o rodopsina; por ejemplo, se pueden utilizar inmunohistoquímica o el uso de un marcador tal como la proteína fluorescente verde mejorada para detectar la expresión de miR-708 y rodopsina.
- En algunas formas de realización, el tratamiento comprende la administración a la retina (por ejemplo, el espacio subretiniano) de un mamífero de una cantidad eficaz de partículas víricas de AAV que comprenden un vector que codifica un miR708 o la rodopsina para tratar a un mamífero, por ejemplo, un ser humano, con RP. En algunas formas de realización, la composición se inyecta en uno o más espacios subretinianos para permitir la expresión de miR-708 o rodopsina en células fotorreceptoras. En algunas formas de realización, la composición se inyecta en una cualquiera de una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez ubicaciones en el espacio subretiniano de la retina.
- En algunas formas de realización, las composiciones que comprenden partículas víricas de rAAV se administran en más de una ubicación simultáneamente o secuencialmente. En alguna forma de realización, las inyecciones múltiples

de partículas víricas de rAAV se administran con una diferencia no superior a una hora, dos horas, tres horas, cuatro horas, cinco horas, seis horas, nueve horas, doce horas o 24 horas.

5 En algunas formas de realización, la composición que comprende las primeras partículas víricas de rAAV que codifican miR-708 y las segundas partículas víricas de rAAV que codifican la rodopsina se administran en una o más ubicaciones simultáneamente o secuencialmente. En alguna forma de realización, las inyecciones múltiples de partículas víricas de rAAV se administran con una diferencia no superior a una hora, dos horas, tres horas, cuatro horas, cinco horas, seis horas, nueve horas, doce horas o 24 horas. En algunas formas de realización, las primeras partículas víricas de rAAV que codifican miR-708 se administran antes de que se administren las segundas partículas víricas de rAAV que codifican la rodopsina. 10 En algunas formas de realización, las primeras partículas víricas de rAAV que codifican miR-708 se administran después de que se administren las segundas partículas víricas de rAAV que codifican la rodopsina.

15 En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un tratamiento para un ser humano con RP mediante la administración de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un vector AAV que codifica miR-708 para suprimir la actividad de una rodopsina mutada y una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un vector AAV que codifica la rodopsina para suplementar a fotorreceptores actividad de rodopsina de tipo silvestre. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica que comprende un vector AAV que codifica miR-708 y la composición farmacéutica que comprende un vector AAV que codifica la rodopsina humana son la misma composición farmacéutica. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica que comprende 20 un vector AAV que codifica miR-708 y la composición farmacéutica que comprende un vector AAV que codifica la rodopsina humana son composiciones farmacéuticas diferentes. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica comprende uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

25 En algunas formas de realización, el volumen de la composición inyectada en el espacio subretiniano de la retina o por vía intravítreo es superior a aproximadamente uno cualquiera de 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l, 4 μ l, 5 μ l, 6 μ l, 7 μ l, 8 μ l, 9 μ l, 10 μ l, 15 μ l, 20 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l, 400 μ l, 500 μ l, 600 μ l, 700 μ l, 800 μ l, 900 μ l o 1 ml, o cualquier cantidad entre los mismos.

30 Las composiciones de la invención (por ejemplo, partículas víricas de AAV que comprenden un vector que codifica miR-708 o la rodopsina) se pueden utilizar solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de RP. El intervalo entre la administración secuencial puede ser en términos de al menos (o, alternativamente, menos de) minutos, horas o días.

V. Constructos de expresión

35 En algunas formas de realización, el transgén (por ejemplo, miARN 708 o rodopsina) está operativamente unido a un promotor. Los ejemplos de promotores incluyen, pero sin limitación, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), el LTR de RSV, el LTR de MoMLV, el promotor de fosfoglicerato quinasa-1 (PGK), un promotor del virus 40 de simio (SV40) y un promotor CK6, un promotor de transtiretina (TTR), un promotor de TK, un promotor sensible a la tetraciclina (TRE), un promotor VHB, un promotor hAAT, un promotor LSP, promotores quiméricos específicos de hígado (LSP), el promotor E2F, el promotor de telomerasa (hTERT); el potenciador de citomegalovirus/promotor de beta-actina de pollo/ β -globina de conejo (promotor CAG; Niwa *et al.*, *Gene*, 1991, 108 (2): 193-9) y el promotor del factor de alargamiento 1-alfa (EF1- α) (Kim *et al.*, *Gene*, 1990, 91 (2): 217-23 y Guo *et al.*, *Gene Ther.*, 1996, 3 (9): 802-10). En algunas formas de realización, el promotor comprende un promotor de β -glucuronidasa humana o un potenciador de citomegalovirus unido a un promotor de β -actina de pollo (CBA). El promotor puede ser un promotor constitutivo, inducible o reprimible. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un vector AAV que comprende un ácido nucleico que codifica miR-708 operativamente unido a un promotor CBA. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un vector AAV que comprende un ácido nucleico que codifica la rodopsina (por ejemplo, rodopsina humana) operativamente unido a un promotor CBA. En 45 algunas formas de realización, la divulgación proporciona un vector AAV que comprende un ácido nucleico que codifica miR-708 y un ácido nucleico que codifica la rodopsina (por ejemplo, rodopsina humana) operativamente unido a un promotor CBA.

55 En algunas formas de realización, el promotor es capaz de expresar el transgén en células fotorreceptoras. En formas de realización, el promotor es un promotor de rodopsina quinasa (RK); por ejemplo, un promotor RK humano. En algunas formas de realización, el promotor es un promotor de opsina; por ejemplo, un promotor de opsina humana o un promotor de opsina de ratón.

60 En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un vector AAV que comprende un ácido nucleico que codifica miR-708 operativamente unido a un promotor RK. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un vector AAV que comprende un ácido nucleico que codifica la rodopsina (por ejemplo, la rodopsina humana) unido operativamente a un promotor RK. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona un vector AAV que comprende un ácido nucleico que codifica miR-708 operativamente unido a un primer promotor RK y un ácido nucleico que codifica la rodopsina operativamente unido a un segundo promotor RK. En algunas formas de realización, el miR-708 comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1. En algunas formas de realización, el miR-708 comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 65

En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 comprende un andamio miR-708 endógeno. En algunas formas de realización, el andamio miR-708 está proporcionado por la SEQ ID NO: 14. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 comprende un andamio miARN heterólogo. En algunas formas de realización, el uso de un andamio miARN heterólogo se utiliza para modular la expresión de miARN; por ejemplo, para aumentar la expresión de miARN o para reducir la expresión de miARN. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 comprende un andamio miR-155 endógeno. En algunas formas de realización, el andamio miR-155 está proporcionado por la SEQ ID NO: 14.

10 *Vector vírico recombinante*

15 La presente divulgación contempla el uso de un genoma vírico recombinante para la introducción de una o más secuencias de ácidos nucleicos que codifican un miARN miR-708 o una proteína rodopsina descritas en el presente documento para empaquetarlas en una partícula vírica de AAV. El genoma vírico recombinante puede incluir cualquier elemento para establecer la expresión de un miARN miR-708 o una proteína rodopsina, por ejemplo, un promotor, un miARN miR-708 o un transgén de rodopsina, una ITR, un elemento de unión al ribosoma, terminador, potenciador, marcador de selección, intrón, señal de poliA y/u origen de replicación.

20 VI. Partículas víricas y procedimientos para producir partículas víricas.

25 *Partículas víricas de rAAV*

30 La invención proporciona composiciones que comprenden partículas de rAAV y composiciones para su uso en procedimientos para tratar retinitis pigmentaria. En algunas formas de realización, la partícula vírica es una partícula de AAV recombinante que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el miARN miR-708 o una proteína rodopsina descrita en el presente documento flanqueada por una o dos ITR. El ácido nucleico se encapsida en la partícula de AAV. La partícula de AAV también comprende proteínas de la cápside. En algunas formas de realización, el ácido nucleico comprende la(s) secuencia(s) de codificación de interés (por ejemplo, ácido nucleico que codifica el miARN miR-708 o una proteína rodopsina), componentes unidos operativamente en la dirección de la transcripción, secuencias de control que incluyen secuencias de iniciación y terminación de la transcripción, formando así un casete de expresión. En algunas formas de realización, el ácido nucleico que codifica miR-708 está integrado en un intrón. El casete de expresión está flanqueado en los extremos 5' y 3' por al menos una secuencia funcional de ITR de AAV. Por "secuencias funcionales de ITR de AAV" se entiende que las secuencias de ITR funcionan según lo previsto para el rescate, la replicación y el empaquetamiento del virión de AAV. Véase Davidson *et al.*, *PNAS*, 2000, 97 (7) 3428-32; Passini *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77 (12): 7034-40; y Pechan *et al.*, *Gene Ther.*, 2009, 16: 10-16. Los vectores recombinantes comprenden al menos todas las secuencias de AAV esenciales para la encapsidación y las estructuras físicas para la infección por el rAAV. No es necesario que las ITR de AAV para su uso en los vectores tengan una secuencia de nucleótidos de tipo silvestre (por ejemplo, tal como se describe por Kotin, *Hum. Gene Ther.*, 1994, 5: 793-801), y pueden alterarse mediante la inserción, la delección o la sustitución de nucleótidos o las ITR de AAV pueden derivarse de cualquiera de entre diversos serotipos de AAV. Actualmente se conocen más de 40 serotipos de AAV, y se siguen identificando nuevos serotipos y variantes de los serotipos existentes. Véase Gao *et al.*, *PNAS*, 2002, 99 (18): 11854-6; Gao *et al.*, *PNAS*, 2003, 100 (10): 6081-6; y Bossis *et al.*, *J. Virol.*, 2003, 77 (12): 6799-810. El uso de cualquier serotipo de AAV se considera dentro del alcance de la presente invención. En algunas formas de realización, un vector rAAV es un vector derivado de ITR de serotipo de AAV, incluidos, sin limitación, serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino o cápside AAV de ratón o similares. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende una ITR de entre ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, a AAV de cabra, AAV bovino o cápside AAV de ratón o similares. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV también codifica miR-708 o rodopsina tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el ácido nucleico presente en el AAV puede comprender al menos una ITR de cualquier serotipo de AAV contemplado en el presente documento y puede codificar adicionalmente un miR-708 que comprende el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o un ácido nucleico que codifica una rodopsina humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende un ácido nucleico de 5' a 3' que codifica lo siguiente: una ITR de AAV, un fragmento de relleno (por ejemplo, SEQ ID NO: 11), un intrón químérico (por ejemplo, SEQ ID NO: 10), un miR-708, una secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, un fragmento de relleno y una ITR de AAV. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende el ácido nucleico de SEQ ID NO: 5. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende un ácido nucleico que es al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la SEQ ID NO: 5. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende el ácido nucleico de SEQ ID NO: 6. En algunas formas de realización, el ácido nucleico en el AAV comprende un ácido nucleico que es al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la SEQ ID NO: 6. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende el ácido nucleico de SEQ ID NO: 7. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende un ácido nucleico que es al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la SEQ ID NO: 7. En algunas formas de realización, el

ácido nucleico presente en el AAV comprende el ácido nucleico de SEQ ID NO: 8. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende un ácido nucleico que es al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la SEQ ID NO: 8. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende el ácido nucleico de SEQ ID NO: 9. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende un ácido nucleico que es al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la SEQ ID NO: 9. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende el ácido nucleico de SEQ ID NO: 24. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende un ácido nucleico que es al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la SEQ ID NO: 24. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende el ácido nucleico de SEQ ID NO: 25. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende un ácido nucleico que es al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la SEQ ID NO: 25. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende el ácido nucleico de SEQ ID NO: 26. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende un ácido nucleico que es al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la SEQ ID NO: 26. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende el ácido nucleico de SEQ ID NO: 27. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende un ácido nucleico que es al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a la SEQ ID NO: 27. En otras formas de realización, la partícula de rAAV comprende proteínas de una cápside de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2 AA, 2-7m DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, AAV de cabra, AAV1/AAV2 químérico, AAV bovino, rAAV2/HBoV1 de cápside AAV de ratón, o mutantes de estas proteínas de cápside. En algunas formas de realización, una proteína de cápside mutante conserva la capacidad de formar una cápside AAV. En algunas formas de realización, la partícula de rAAV comprende la cápside mutante de tirosina AAV5 (Zhong L. *et al.*, (2008) *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (22): 7827-7832. En otras formas de realización, la partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside de un serotipo AAV de los clados A-F (Gao *et al.*, *J. Virol.* 2004, 78 (12):6381). En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende la secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5-8, y está flanqueada por al menos una ITR de AAV2. En algunas formas de realización, el ácido nucleico presente en el AAV comprende la secuencia de ácidos nucleicos que es al menos aproximadamente el 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica al ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5-9, y está flanqueado por al menos una ITR de AAV2.

Se utilizan diferentes serotipos de AAV para optimizar la transducción de células diana particulares o para dirigirse a tipos de células específicos dentro de un tejido diana particular (por ejemplo, un tejido enfermo) Una partícula de rAAV puede comprender proteínas víricas y ácidos nucleicos víricos del mismo serotipo o un serotipo mixto. Por ejemplo, en algunas formas de realización, una partícula de rAAV puede comprender proteínas de cápside AAV5 y al menos una ITR de AAV2 o puede comprender proteínas de cápside AAV2 y al menos una ITR de AAV5. En otras formas de realización, una partícula de rAAV puede comprender proteínas de cápside mutantes de tirosina AAV5 y al menos una ITR de AAV2. En otro ejemplo más, una partícula de rAAV puede comprender proteínas de cápside tanto de AAV5 como de AAV2, y además comprender al menos una ITR de AAV2. Cualquier combinación de serotipos de AAV para la producción de una partícula de rAAV se proporciona en el presente documento como si cada combinación se hubiera indicado expresamente en el presente documento. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona partículas de rAAV que comprenden proteínas de cápside AAV5 y un ácido nucleico que codifica el ARN miR-708 o un transgén de rodopsina, flanqueado por al menos una ITR de AAV2.

45 *Genomas víricos de AAV autocomplementarios*

En algunos aspectos, la divulgación proporciona partículas víricas que comprenden un genoma recombinante autocomplementario. Las partículas víricas de AAV con genomas autocomplementarios y los procedimientos de uso de genomas de AAV autocomplementario se describen en las patentes de Estados Unidos Nº 6.596.535; 7.125.717; 7.765.583; 7.785.888; 7.790.154; 7.846.729; 8.093.054 y 8.361.457; y Wang Z., *et al.*, (2003) *Gene Ther* 10: 2105-2111. Un rAAV que comprende un genoma autocomplementario formará rápidamente una molécula de ADN bícatenaria en virtud de sus secuencias parcialmente complementarias (por ejemplo, complementando las cadenas codificantes y no codificantes de un transgén). En algunas formas de realización, la divulgación proporciona una partícula vírica de AAV que comprende un genoma de AAV, en la que el genoma de rAAV comprende una primera secuencia de polinucleótidos heteróloga (por ejemplo, miR-708 o una cadena codificante de rodopsina) y una segunda secuencia de polinucleótidos heteróloga (por ejemplo, cadena antisentido de miR-708 o una cadena no codificante o antisentido de rodopsina) en las que la primera secuencia de polinucleótidos heteróloga puede formar pares de bases dentro de la cadena con la segunda secuencia de polinucleótidos a lo largo de la mayor parte o la totalidad de su longitud. En algunas formas de realización, la primera secuencia de polinucleótidos heteróloga y una segunda secuencia de polinucleótidos heteróloga están unidas por una secuencia que facilita el emparejamiento de bases dentro de la cadena; por ejemplo, una estructura de ADN en horquilla. Las estructuras de horquilla son conocidas en la técnica, por ejemplo en moléculas de ARNip. En algunas formas de realización, la primera secuencia de polinucleótidos heterólogos y una segunda secuencia de polinucleótidos heterólogos están unidas por una ITR mutado (por ejemplo, la ITR derecha). En algunas formas de realización, la ITR comprende la secuencia de polinucleótidos 5'-CACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGGTCGC

CCACGCCGGGCTTGCCGGCG-3' (SEQ ID NO: 20). La ITR mutado comprende una delección de la región D que comprende la secuencia de resolución terminal. Como resultado, al replicar un genoma vírico de AAV, las proteínas rep no escindirán el genoma vírico en la ITR mutado y, como tal, un genoma vírico recombinante que comprende lo siguiente en el orden 5' a 3' se empaquetará en una cápside vírica: una ITR de AAV, la primera secuencia de polinucleótidos heteróloga que incluye secuencias reguladoras, la ITR de AAV mutada, el segundo polinucleótido heterólogo en orientación inversa con respecto al primer polinucleótido heterólogo y una tercera ITR de AAV. En algunas formas de realización, la divulgación proporciona partículas víricas de AAV que comprenden un genoma vírico recombinante que comprende una ITR de AAV2 funcional, una primera secuencia de polinucleótidos que codifica el ARN miR-708 o un transgén de rodopsina, una ITR de AAV2 mutada que comprende una delección de la región D y que carece de una secuencia de resolución terminal funcional, una segunda secuencia de polinucleótidos que comprende la secuencia complementaria a la secuencia que codifica el ARN miR-708 o una rodopsina, de la primera secuencia de polinucleótidos y una ITR de AAV2 funcional.

15 *Producción de partículas de AAV*

Las partículas de rAAV se pueden producir utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 6.566.118, 6.989.264 y 6.995.006. En la puesta en práctica de la invención, las células huésped para producir partículas de rAAV incluyen células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, microorganismos y levaduras. Las células huésped también pueden ser células de empaquetamiento en las que los genes rep y cap de AAV se mantienen de forma estable en la célula huésped o células productoras en las que el genoma del vector AAV se mantiene de forma estable. Las células productoras y de empaquetamiento ejemplares se derivan de células 293, A549 o HeLa. Los vectores AAV se purifican y se formulan utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica.

20 En algunos aspectos se describe un procedimiento, que no forma parte de la presente invención, para producir cualquier partícula de rAAV tal como se divulga en el presente documento que comprende (a) cultivar una célula huésped en condiciones en las que se produzcan partículas de rAAV, en el que la célula huésped comprende (i) uno o más genes del paquete de AAV, en el que cada dicho gen de empaquetamiento de AAV codifica una proteína de replicación y/o encapsidación de AAV; (ii) un pro-vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica ARN miR-708 o cualquier transgén de rodopsina tal como se describe en el presente documento flanqueado por al menos una ITR de AAV y (iii) una función auxiliar de AAV; y (b) recuperar las partículas de rAAV producidas por la célula huésped. En algunas formas de realización, un ácido nucleico codifica el ARN miR-708 de SEQ ID NO: 1 o un transgén que codifica una rodopsina; por ejemplo, una rodopsina con el aminoácido de la SEQ ID NO: 2. En algunas formas de realización, dicha, al menos una, ITR de AAV se selecciona del grupo que consiste en una ITR de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón o similar. En algunas formas de realización, dicha proteína de encapsidación se selecciona del grupo que consiste en AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 (por ejemplo, una cápside AAV6 de tipo silvestre, o una cápside AAV6 variante tal como ShH10, tal como se describe en la publicación PG de Estados Unidos 2012/0164106), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9 (por ejemplo, una cápside AAV9 de tipo silvestre, o una cápside AAV9 modificada tal como se describe en la publicación PG de Estados Unidos 2013/0323226), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, un mutante de la cápside de tirosina, un mutante de la cápside de unión a heparina, una cápside AAV2R471A, una cápside AAVAAV2/2-7m8, una cápside AAV DJ (por ejemplo, una cápside AAV-DJ/8, una cápside AAV-DJ/9, o cualquier otra cápside descrita en la publicación PG de Estados Unidos 2012/0066783), cápside AAV2 N587A, cápside AAV2 E548A, cápside AAV2 N708A, cápside AAV V708K, cápside AAV de cabra, cápside químérica AAV1/AAV2, cápside AAV bovina, cápside AAV de ratón, cápside AAV2/HBoV1, una cápside AAV descrita en la patente de Estados Unidos Nº 8.283.151 o la publicación internacional Nº WO/2003/042397 o mutantes de los mismos. En algunas formas de realización, la proteína de encapsidación es una proteína de cápside mutante de tirosina AAV5. En otras formas de realización, la partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside de un serotipo AAV de los clados A-F. En algunas formas de realización, las partículas de rAAV comprenden una cápside AAV5 y un genoma recombinante que comprende ITR de AAV2, una ITR de AAV2 mutante y ácido nucleico que codifica miR-708 o la rodopsina. En algunas formas de realización, las partículas de rAAV comprenden una cápside mutante de tirosina AAV5 y un genoma recombinante que comprende ITR de AAV2, una ITR de AAV2 mutante y ácido nucleico que codifica miR-708 o la rodopsina. En una forma de realización adicional, las partículas de rAAV están purificadas. El término "purificadas", tal como se utiliza en el presente documento, incluye una preparación de partículas de rAAV desprovistas de al menos algunos de los otros componentes que también pueden estar presentes en la que las partículas de rAAV se producen de forma natural o se preparan inicialmente. Así, por ejemplo, pueden prepararse partículas de rAAV aisladas utilizando una técnica de purificación para enriquecerlas a partir de una mezcla fuente, tal como un lisado de cultivo o un sobrenadante de cultivo de producción. El enriquecimiento se puede medir de varias formas, tales como, por ejemplo, proporcionando partículas resistentes a DNasa (DRP) o copias del genoma (gc) presentes en una solución, o por infectividad, o se puede medir con respecto a una segunda sustancia potencialmente interferente presente en la mezcla fuente, tales como contaminantes, incluidos contaminantes de cultivo de producción o contaminantes en proceso, incluidos virus auxiliares, componentes de medios y similares.

65 También se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden partículas de rAAV que comprenden un transgén que codifica miR-708 y partículas de rAAV que comprenden un transgén de

rodopsina. Las composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para cualquier modo de administración descrito en el presente documento. Una composición farmacéutica descrita en el presente documento, puede introducirse en el ojo; por ejemplo, por administración subretiniana o administración intravítreas.

- 5 En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden rAAV descritos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable son adecuadas para su administración a seres humanos. Dichos vehículos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas que comprenden rAAV descritos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable son adecuadas para inyección ocular. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceite, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y similares. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa, polietilenglicol (PEG) y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. La composición farmacéutica puede comprender además ingredientes adicionales, por ejemplo conservantes, tampones, agentes de tonicidad, antioxidantes y estabilizantes, agentes humectantes o clarificantes no iónicos, agentes que aumentan la viscosidad y similares. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden envasarse en dosis unitarias únicas o en formas multidosis. Las composiciones se formulan generalmente como solución estéril y sustancialmente isotónica.
- 10
- 15

20 **VII. Kits**

También se proporcionan kits para su uso tal como se describe en el presente documento. En algunos aspectos, los kits comprenden las composiciones descritas en el presente documento (por ejemplo, partículas de rAAV que comprenden ácido nucleico que codifica el ARN miR-708 o un transgén de rodopsina) en un envase adecuado. Los envases adecuados para las composiciones (tales como las composiciones oculares) descritas en el presente documento son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, viales (tales como viales sellados), recipientes, ampollas, botellas, frascos, envases flexibles (por ejemplo, bolsas Mylar selladas o bolsas de plástico) y similares. Estos artículos de fabricación también pueden esterilizarse y/o sellarse.

- 30 La presente divulgación también proporciona kits que comprenden composiciones descritas en el presente documento y pueden comprender además instrucciones de uso de la composición, tales como los usos descritos en el presente documento. Los kits descritos en el presente documento pueden incluir también otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para el tratamiento tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el kit comprende un rAAV que comprende un transgén que codifica el ARN miR-708 o un transgén de rodopsina para la administración intraocular de al menos 1×10^9 copias del genoma a un primate tal como se describe en el presente documento, un vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado para inyección intraocular, y uno o más de: un tampón, un diluyente, un filtro, una aguja, una jeringa y un prospecto con instrucciones para realizar inyecciones oculares. En algunas formas de realización, el kit comprende instrucciones para tratar la retinitis pigmentaria con las partículas de rAAV descritas en el presente documento. En algunas formas de realización, el kit comprende instrucciones para reducir el estrés del RE en una célula con las partículas de rAAV descritas en el presente documento. En algunas formas de realización, el kit comprende instrucciones para utilizar las partículas de rAAV descritas en el presente documento según cualquiera de los tratamientos descritos en el presente documento.
- 35
- 40

45 **EJEMPLOS**

La invención se entenderá más completamente mediante referencia a los ejemplos siguientes.

50 **Ejemplo 1: Desarrollo de un modelo celular de retinitis pigmentaria**

Una estrategia terapéutica para la RP autosómica dominante asociada a RHO sería atenuar (*knock down*) tanto la rodopsina mutante como la de tipo silvestre y aliviar el estrés del RE. Esto podría lograrse mediante la administración conjunta de un micro-ARN (miR) que inhibiría los alelos de la rodopsina y, opcionalmente, la administración conjunta de una secuencia de rodopsina de tipo silvestre refractaria a la atenuación por parte de la miR administrada de forma exógena. Un miR regulado por CHOP, miR-708, regula la expresión de rodopsina (Behrman, S. *et al.* (2011) *J. Cell Biol.* 192 (6): 919-27). El miR-708 es un miR intrónico que reside en el gen Odz4 inducible por CHOP (Tenurin-4). El CHOP regula la expresión de miR-708 durante el estrés del RE, y hay una secuencia de miR-708 putativa en la UTR 3' de la rodopsina.

- 60 En el presente documento se describen procedimientos para utilizar un vector AAV para administrar miR-708 exógeno dirigido a la rodopsina tanto de tipo silvestre como mutante a través de la secuencia diana de miR-708 UTR 3' presente en ambos alelos. En formas de realización, una secuencia de reemplazo de rodopsina de tipo silvestre también se administra conjuntamente. Esta secuencia de rodopsina de reemplazo puede diseñarse para que tenga una unión reducida a miR-708 (por ejemplo, sustitución, delección o adición de nucleótidos a la UTR 3') y, por lo tanto, será refractaria a la atenuación por miR-708 exógeno. En formas de realización, la secuencia de rodopsina de reemplazo
- 65

carece de una secuencia diana de miR-708 UTR 3'. En resumen, estos vectores AAV atenuarían la expresión de la rodopsina que causa estrés del RE (y, por lo tanto, la muerte de la célula fotorreceptora) y, opcionalmente, suplementarían la expresión de un gen de rodopsina de tipo silvestre, u optimizado por codón, que es refractaria a la atenuación inducida por miR-708, restaurando así la expresión normal y la función de la rodopsina.

5

Procedimientos

Cultivo de células

- 10 Se diseñaron por ingeniería genética células HEK-293 que expresan rodopsina P23H humana o de ratón utilizando el sistema inducible por tetraciclina T-Rex de Invitrogen. Las células confluentes presentes en placas de 6 pocillos se transfecaron con 4 µg de vector miR-708 (pcDNA) o un vector miARN de control utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección, el medio se reemplazó por medio que contenía tetraciclina 2 µM. Las células se incubaron durante 24 horas adicionales y el medio se retiró de cada pocillo.
- 15

Inmunotransferencia Western

- 20 Las células se lisaron en 400 µl de tampón RIPA (Thermo Scientific) que contenía PMSF 1 mM, y se hicieron pasar a través de una jeringa de 25 g varias veces. El lisado se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min. Las células se mantuvieron a 4 °C durante todo el proceso. Se cargaron 30 µl de sobrenadante en un gel Bis/Tris al 4-12% y se realizó SDS-PAGE en tampón MOPS (Invitrogen). Después se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa utilizando el sistema I-Blot de Invitrogen. La membrana se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente en PBS que contenía Tween-20 al 0,05% (PBS-T) e I-Block al 0,1% (Invitrogen). La membrana se incubó durante toda la noche a 4 °C en PBS-T que contenía 1 µg/ml de anticuerpo monoclonal (mAb) 1D4 anti-rodopsina (Abcam). Después de lavar varias veces en PBS-T, la membrana se incubó en una solución de anticuerpo secundario que contenía una dilución 1:1000 de anticuerpo (Ab) conjugado con IgG HRP anti-ratón (R&D Systems) durante una hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó en PBS-T varias veces y se desarrolló utilizando reactivo ECL (Thermo Scientific). Los niveles de proteína m-rodopsina se cuantificaron utilizando el programa informático Image-J.
- 25
- 30 La membrana se despojó de proteínas en PBS que contenía glicina 0,1 M, pH 2, y después se enjuagó varias veces en PBS-T. Después se evaluó la membrana para detectar hGAPDH en PBS-T que contenía una dilución 1:20.000 de anticuerpo políclonal (pAb) anti-GAPDH (Sigma) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar varias veces en PBS-T, el anticuerpo secundario (IgG-HRP anticonejo, R&D Systems) se diluyó 1:1000 en PBS-T y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana se lavó varias veces y se desarrolló utilizando reactivo ECL (Thermo Scientific). Los niveles de proteína m-rodopsina se normalizaron después a niveles de proteína hGAPDH utilizando el programa informático Image J.
- 35

Atenuación endógena de miR-708 en células HEK-293

- 40 Se transfecaron células HEK-293 que expresan rodopsina de ratón o humana (descrita anteriormente) con 100 pmol de pre-miR-708, anti-miR-708 o miARN de control (Ambion) utilizando el protocolo de lipofectamina 2000 para la transfección con moléculas de ARNip (Invitrogen). A las 48 horas después de la transfección, el medio se reemplazó por medio que contenía tetraciclina 2 µM para inducir la expresión de rodopsina. 24 horas después, cada pocillo se dividió en 2 muestras. Una de ellas se evaluó para determinar m-rodopsina y hGAPDH utilizando el protocolo de inmunotransferencia Western anterior, y se extrajo ARN de la otra para el análisis TaqMan® (Life Technologies) de rodopsina y la expresión de ARN miR-708. El ARN total (incluidos los ARN pequeños) se extrajo de las células utilizando el kit miRNeasy de Qiagen, según las instrucciones del fabricante, incluido el tratamiento con ADNasa de las muestras. Se sintetizó ADNc a partir del ARN total utilizando el sistema de transcripción inversa Quantitect de Qiagen. Se añadió ADNc a ensayos de expresión génica TaqMan® de m-rodopsina, hCHOP (*Ddit3*), hBiP (*Hspa5*) o hGAPDH (Life Technologies). La expresión génica se normalizó con respecto a hGAPDH utilizando el procedimiento $\Delta\Delta C_t$. La expresión de miR-708 se cuantificó utilizando el ensayo de expresión TaqMan® de miR-708 (Life Technologies). La expresión de miR-708 se presentó con respecto a la expresión de miR-16 endógeno utilizando el procedimiento $\Delta\Delta C_t$.
- 45
- 50
- 55

Expresión dirigida por el promotor de rodopsina quinasa de miR-708 en células WERI Rb-1

- 60 La secuencia miR-708 se subclonó aguas abajo del promotor de rodopsina quinasa (RK) después de la escisión del vector pcDNA 6.2 GW (sistema Block-iT, Invitrogen) en el vector pRK-MVM, que contenía el promotor hRK nativo y las secuencias de intrón MVM. Se transfecaron células WERI Rb-1 (ATCC) con 2 µg de vector pRK-miR-708 o pRK-miR-Control utilizando Fugene-HD (Promega), según las instrucciones del fabricante. A las 48 horas después de la transfección se recogieron las células y se extrajo el ARN total (incluidos los ARN pequeños) utilizando el protocolo del kit miRNeasy (Qiagen). Se cuantificó el miR-708 en cada muestra utilizando el ensayo de expresión génica TaqMan® de miR-708 (Life Technologies) tal como se describió anteriormente. Para cuantificar la atenuación de m-rodopsina en células WERI Rb-1 que expresan miR-708, las células se cotransfектaron con 2 µg de cada uno de pRK-miR-708 (o control) y pSport6 m-rodopsina P23H utilizando Fugene-HD según las instrucciones del fabricante
- 65

(Promega). El ARN se extrajo tal como se describe y los niveles de ARN de m-rodopsina se cuantificaron tal como se ha descrito anteriormente utilizando el procedimiento $\Delta\Delta Ct$ con respecto a niveles de ARN de hGAPDH.

Extracción de ARN de retinas de ratón a las que se inyectaron vectores AAV

5 El ARN se extrajo de las retinas de ratón utilizando el kit miRNeasy según las instrucciones del fabricante (Qiagen). Se homogeneizaron retinas de ratón individuales en tampón de lisis Qiazol utilizando perlas de circonia/sílice de 1 mm (Biospec) durante 10 minutos. Después de la homogeneización se extrajo el ARN según las instrucciones del fabricante. Los niveles de miR-708 en cada retina se cuantificaron utilizando el sistema de cuantificación de microARN 10 qStar (Origene). El ADNc se sintetizó utilizando el kit de síntesis de primera cadena de ADNc (Origene), seguido de la amplificación y cuantificación específica de miR-708 utilizando cebadores específicos de miR-708 y un patrón de copia de miR-708 (Origene). Para la cuantificación de los niveles de rodopsina en ojos de ratón que recibieron inyección, la m-rodopsina se amplificó utilizando cebadores específicos (Life Technologies) y se cuantificó frente a un patrón de ADNc de rodopsina. Los niveles de RdCVF se analizaron cualitativamente frente a la expresión de GAPDH utilizando 15 el procedimiento $\Delta\Delta Ct$.

Vector de supresión/reemplazo de rodopsina

20 El ADNc de h-rodopsina (con secuencias de UTR no flanqueantes) se clonó en el vector pRK por escisión a partir del vector pcDNA y se realizó un ligado de extremos romos en pRK-MCS. Se sintetizó ADNc (Biobasic) que contenía la secuencia promotora de h-rodopsina quinasa y el intrón de h- β -globina con una inserción de secuencia de h-miR-708 (secuencia tomada de Genbank/NCBI) ubicada entre los sitios aceptores/donantes de ayuste de intrón. Esta secuencia se subclonó a partir del vector pUC57, se ligó en el vector pcDNA h-rodopsina y se renombró pRK-miR-708 hRho/wt. Los niveles de proteína miARN-708 y de h-rodopsina se analizaron tal como se ha descrito anteriormente en células 25 WERI Rb-1 transfectadas.

Cuantificación de ayuste de XBP-1 en células WERI Rb-1 transfectadas con m-rodopsina P23H

30 Se cotransfectaron células hWERI Rb-1 con el vector pcDNA que codifica una m-rodopsina con mutación P23H no glucosilada y el vector pRK-miR-708. Este ADNc de rodopsina P23H se mutó utilizando mutagénesis por PCR dirigida al sitio (Agilent Technologies) para cambiar dos codones de asparagina (en las posiciones 2 y 5) por alanina. Las células se transfectaron tal como se describe con 2 μ g de cada vector y se incubaron durante 72 horas. El ARN total se recogió de las células tal como se ha descrito anteriormente. El ADNc se sintetizó utilizando el kit de síntesis de 35 ADNc de alta capacidad High Capacity cDNA (Invitrogen). El ayuste de XBP-1 se evaluó utilizando cebadores específicos para XBP-1 y High Fidelity PCR MasterMix (Roche). Las secuencias amplificadas se analizaron en un gel de agarosa al 2% y se cuantificaron las cantidades relativas de tránskrito XBP-1 ayustado (~280 nt) frente a no ayustado (~300 nt) utilizando el programa informático Image-J.

Procedimientos adicionales

40 Los procedimientos para inmunofluorescencia, inmunotransferencia Western con y sin tratamiento con endoglicosidasa H, expresión de marcador UPR y tinción con TUNEL de células que expresan rodopsina de tipo silvestre o mutante P23H se realizaron tal como se describe por Adamowicz, M. et al. (2012) Adv. Exp. Medicina. Biol. 723: 573-9.

45 Resultados

50 Se transfectaron transitoriamente células epiteliales pigmentadas de retina humana (RPE) con un gen que codifica la rodopsina humana tanto de tipo silvestre (WT) como mutante P23H (una mutación vinculada a RP). La ubicación de la rodopsina se investigó mediante microscopía de inmunofluorescencia confocal utilizando anticuerpos anti-rodopsina. En el caso de la proteína de tipo silvestre, la mayor parte de la proteína se procesó en la membrana plasmática (figura 1A), lo que indica una biogénesis normal. Por el contrario, el mutante P23H mostró una distribución perinuclear/reticular característica de retención en el retículo endoplásmico (RE), casi sin expresión en la superficie celular (figura 1B). Estos resultados demuestran que la rodopsina mutante P23H no puede transportarse adecuadamente a la membrana plasmática y, en cambio, se retiene en el RE.

55 La agregación de rodopsina se evaluó mediante análisis de inmunotransferencia SDS-PAGE de extractos solubles en detergente de células RPE que expresan transitoriamente proteína de tipo silvestre o mutante P23H (figura 2A). La rodopsina de tipo silvestre migró predominantemente como una banda difusa a una masa molecular de ~40 kDa. Esta especie corresponde a rodopsina madura monomérica que contiene glucanos N-unidos. La movilidad de la rodopsina mutante P23H difería notablemente de la rodopsina de tipo silvestre, migrando la mayor parte de P23H como dímeros y oligómeros de mayor peso (figura 2A). El P23H también fue sensible a la endoglicosidasa H: nótese que el tratamiento con endoglicosidasa H afecta a la migración de la rodopsina P23H, pero no a la de tipo silvestre, tal como se muestra en la figura 2B. La endoglicosidasa H es específica para estructuras de oligosacáridos N-unidos con alto contenido en manosa, glicosiladas en el núcleo, típicas de proteínas que no han madurado más allá del RE.

Conjuntamente, estos datos sugieren que en las células RPE la rodopsina de tipo silvestre es capaz de plegarse y madurar más allá del RE, mientras que el mutante P23H es más propenso a formar oligómeros no nativos y se retiene dentro del RE, tal vez debido a su incapacidad para plegarse productivamente.

- 5 A continuación, se evaluó la capacidad de la rodopsina P23H para inducir estrés del RE en células RPE transfectadas midiendo los niveles de dos marcadores de las UPR, BiP y CHOP. Se detectaron niveles elevados de ARNm de BiP en células que expresan transitoriamente rodopsina tanto WT como P23H (figura 3A), lo que sugiere que aumentar la carga de plegamiento del RE indujo de por sí la UPR. Sin embargo, la expresión de ARNm de BiP fue significativamente mayor en células que expresan rodopsina P23H (43 veces con respecto a células no transfectadas) en comparación con células que expresan rodopsina WT (14 veces con respecto a células no transfectadas) (figura 3A). Los niveles de ARNm de rodopsina fueron idénticos en las células que expresan WT o formas mutantes de la proteína (figura 3A). Por lo tanto, la rodopsina P23H es un inductor de BiP más potente que la rodopsina WT. Sin desear vincularse a ninguna teoría, esta discrepancia puede deberse al defecto de plegamiento de la proteína mutante.
- 10 15 A continuación se examinó la expresión de CHOP. Las células que expresan la proteína rodopsina WT mostraron una inducción 15 veces mayor de CHOP en comparación con células no transfectadas, mientras que las células que expresan el mutante P23H mostraron una inducción aún mayor de 23 veces (figura 3A). Como el CHOP es un factor de transcripción inducido por UPR que media la apoptosis (Lee, E.S., *et al.* (2007) *FEBS Lett.* 581 (22): 4325-32), se midieron los niveles relativos de apoptosis entre células que expresan WT y mutantes P23H. Según los niveles de ARNm de CHOP, los resultados del ensayo TUNEL sugirieron además que las células RPE que expresan transitoriamente el mutante P23H son más propensas a la apoptosis que las que expresan la rodopsina de tipo silvestre (figura 3B).
- 20 25 **Ejemplo 2: La modulación de niveles de miR-708 regula la expresión de rodopsina y la UPR en células HEK-293**

30 Se ha encontrado una secuencia de consenso correspondiente a un sitio diana de miR-708 putativo en la UTR 3' de varios genes de rodopsina de mamíferos (Behrman, S. *et al.* (2011) *J. Cell Biol.* 192 (6): 919-27). Este ejemplo demuestra que la regulación por miR-708 de la rodopsina puede utilizarse como una herramienta para modular la expresión de la rodopsina en células cultivadas.

35 Se transfectaron células HEK-293 que expresan un gen de m-rodopsina mutante P23H que codifica una secuencia diana UTR 3' de miR-708 con un plásmido que expresa miR-708 o miR-Control tal como se representa en la figura 4. Después de 72 horas, se recogieron las células y se analizó la expresión de la proteína rodopsina mP23H utilizando inmunotransferencia Western (figura 5). La expresión de la proteína m-rodopsina P23H se redujo a ~30% en células transfectadas con CBA-miR-708, en comparación con células transfectadas con un vector CBA-miR-Control.

40 45 La expresión de genes diana de UPR (CHOP/BIP) también se analizó mediante el análisis de expresión génica TaqMan®. Las células HEK-293 que expresan miR-708 también mostraron una expresión reducida de ARN de CHOP y BiP en comparación con las células de control (figura 6). Estos resultados sugieren que la reducción del nivel de m-rodopsina P23H plegada incorrectamente da como resultado una reducción concomitante en la expresión de genes de UPR BiP y CHOP.

50 55 En el experimento inverso, se transfectaron células HEK-293 que expresaban la rodopsina P23H de ratón (incluida una secuencia diana de miR-708 UTR 3') o la rodopsina P23H humana (sin la secuencia diana de miR-708 UTR 3') con pre-miARN anti-miR-708 o pre-miARN de control negativo (figura 7). En este experimento, se utilizó anti-miR-708 exógeno para inhibir miR-708 de HEK293 endógeno. Si el miR-708 endógeno regulaba la expresión de rodopsina a través de la secuencia diana de miR-708 putativa, entonces los cambios en niveles de rodopsina P23H se observarían solo si hubiera una secuencia diana de miR-708 en la UTR 3' del gen de rodopsina. Las células se transfectaron con 100 pmol de cada ARN. Se generaron lisados celulares y se cuantificó la proteína rodopsina en una inmunotransferencia Western, mientras que los niveles de ARNm se analizaron mediante análisis TaqMan® (figura 7). La inhibición de miR-708 endógeno dio como resultado un aumento tanto del ARNm de rodopsina de ratón como de proteína (figura 7A), mientras que los niveles tanto de ARNm de rodopsina humana como de proteína no se vieron afectados (figura 7B), a pesar de los niveles más bajos de miR-708 endógeno. Estos resultados demuestran que la regulación de la rodopsina por miR-708 requiere la secuencia diana de miR-708 en la UTR 3' de rodopsina.

60 Conjuntamente, estos resultados muestran que la rodopsina es una diana funcional de miR-708, y que la modulación de la actividad de miR-708 puede utilizarse como una herramienta para influir en la expresión de rodopsina.

65 **Ejemplo 3: Diseño de un plásmido ITR de AAV que expresa miR-708 bajo el control del promotor de rodopsina quinasa específica de fotorreceptores**

Se cree que la acumulación de proteína rodopsina mutante en el RE contribuye al estrés del RE subyacente a la muerte celular de fotorreceptores en RP. El ejemplo anterior demuestra que la expresión de miR-708 es capaz de regular los niveles generales de rodopsina. Se construyó un vector basado en virus adenoasociados (AAV) para la expresión específica de miR-708 en las células fotorreceptoras de la retina para determinar si la disminución de los

niveles totales de rodopsina (incluidas las formas de tipo silvestre y mutantes) puede aliviar el estrés del RE independientemente de la mutación de rodopsina.

5 La figura 8 representa un plásmido de repetición terminal invertida (ITR) de AAV diseñado para expresar miR-708 específicamente en células fotorreceptoras retinianas. La expresión de miR-708 fue dirigida por el promotor de la rodopsina quinasa (pRK), que se expresa específicamente en células fotorreceptoras bastón. En este vector, miR-708 se expresó a partir del andamio miR-155 que se muestra en la figura 4.

10 A continuación, este plásmido ITR de AAV se validó en células cultivadas. Las células WERI o RPE se transfectaron con el plásmido pre-vírico descrito en la figura 8, y los niveles de miR-708 se cuantificaron mediante análisis TaqMan®. La figura 9A muestra que las células WERI transfectadas con el plásmido miR-708 dirigido por pRK tuvieron un aumento de más de 2000 veces en los niveles de miR-708 en comparación con células WERI transfectadas con un plásmido que expresa miR-Scramble (control). Por el contrario, las células RPE, en las que el promotor RK no se expresa significativamente, no mostraron un aumento significativo en los niveles de miR-708 (figura 9A).

15 La función de miR-708 en la regulación de la expresión de rodopsina se confirmó cotransfectando el plásmido pRK-miR-708 (o un plásmido miR-Control) y un plásmido con el gen de rodopsina de ratón P23H que alberga una secuencia diana de miR708 3' en células WERI. La figura 9B muestra que el ARNm de m-rodopsina P23H se redujo en presencia del miR-708, en comparación con un miR-Control. Estos resultados demuestran que la expresión de miR-708 20 utilizando un vector ITR de AAV es eficaz para reducir la expresión de rodopsina en células fotorreceptoras.

Ejemplo 4: Atenuación de rodopsina en retinas de ratón utilizando un vector miR-708 AAV5

25 Para evaluar si un vector AAV podría utilizarse para reducir la expresión de rodopsina en la retina *in vivo*, el plásmido pRK-miR-708 descrito en la figura 8 se empaquetó en una cápside AAV5 para generar AAV5-RK miR-708. Además, se generó un vector AAV5 miR-Control. Se administró a ratones C57bl de tipo silvestre una inyección subretiniana de 1 x 10⁸ vgs de AAV5-RK miR-708 o AAV5 miR-Control en el ojo contralateral. Al mes después de la inyección, los ratones se sacrificaron y la neurorretina se extrajo y se congeló rápidamente para el análisis por qPCR de la expresión génica.

30 30 La figura 10A muestra que los ojos de ratón a los que se había inyectado un vector AAV5 que expresa miR-708 habían reducido la expresión de rodopsina, en comparación con los ojos de ratones a los que se había inyectado un vector AAV5 miR-Control. Por el contrario, la expresión de otro gen específico de bastones, el factor de viabilidad de conos derivado de bastones (RdCVF), no se vio afectada (figura 10B). La figura 10C confirma que los ojos a los que se inyectó el vector AAV5miR708 mostraron un aumento significativo en el número de copias de miR-708, en comparación con los ojos que recibieron el AAV5miR-control. Estos resultados sugieren que los vectores basados en AAV que expresan miR-708 en fotorreceptores de bastón son eficaces para reducir la expresión de rodopsina endógena *in vivo*.

40 40 Para demostrar la relevancia funcional de la atenuación de la rodopsina, los ojos de ratón tratados con AAV5 miR-708 o AAV5 miR-Control se analizaron mediante electrorretinograma (ERG) para evaluar la función retiniana. Los ojos que recibieron el vector AAV5 miR-708 mostraron una respuesta escotópica disminuida, tal como se esperaba si se reducen los niveles de rodopsina (figura 11A). Las respuestas de ERG escotópico son una evaluación de la función de los bastones, y esta medición puede correlacionarse con los niveles de rodopsina. Sin embargo, la función de los conos en los mismos animales, evaluada por ERG fotópico, se mantuvo sin cambios después de la administración de AAV5 miR-708 (figura 11B), confirmando que miR-708 tenía un efecto biológico sobre las células fotorreceptoras bastón al tiempo que evitaba las células de cono. Estos datos demuestran que el suministro de AAV5 miR-708 produce un efecto biológico que está restringido a la célula bastón diana.

Ejemplo 5: Construcción de un vector de supresión/reemplazo de h-rodopsina con un casete de expresión miR-708 integrado en intrón

55 55 El miR-708 se expresa normalmente *in vivo* a partir del primer intrón en el gen *ODZ4*. Por lo tanto, se diseñó un constructo novedoso basado en la secuencia de miR-708 y su secuencia de andamio/flanqueante endógena. La secuencia de miR-708 se integró en un intrón sintético y se clonó aguas abajo del promotor específico de fotorreceptores rodopsina quinasa (RK), pero aguas arriba del ADNc de h-rodopsina. La secuencia de miR-708 endógena que incluye sus secuencias reguladoras y de procesamiento flanqueantes se clonó en la secuencia de intrón de β-globina aguas arriba de la secuencia de ADNc de h-rodopsina pero aguas abajo del promotor RK. Como tal, la secuencia miR-708 es 5' con respecto a la secuencia codificante de la rodopsina.

60 60 La figura 12 proporciona un diagrama de este vector de supresión/reemplazo 5'. La h-rodopsina (que carece de una secuencia diana de miR708 UTR 3') se controló con el promotor RK. La secuencia de miR-708 endógena que incluye el andamio endógeno (por ejemplo, que incluye cualquier motivo de reconocimiento de DroshalDicer) se integró en el intrón de β-globina. Se incluyó ADNc de h-rodopsina (sin secuencia diana de miR-708 UTR 3') aguas abajo del sitio de unión de ayuste. El miR-708 se integró en la β-globina, que se encuentra aguas abajo del promotor RK, y por lo

tanto, el miR-708 se procesó después del ayuste de la secuencia intrónica de β -globina. Además, se generó un vector con una estructura similar que alberga un miR de control.

5 El vector descrito en la figura 12 o un vector con un miARN de control se utilizó para transfectar células WERI. Se utilizaron células WERI porque expresan poco miR-708 endógeno, si es que expresan algo, y son permisivas con respecto al promotor RK. Las células WERI se cotransfectaron con un ADNc que codifica m-rodopsina P23H (con una secuencia UTR 3' de miR-708). Tanto la eliminación de rodopsina (niveles de ARN) como los niveles de los genes de UPR CHOP y BiP se examinaron en células transfectadas.

10 10 La figura 13 muestra que las células cotransfectadas con m-rodopsina (P23H) y el vector miR-708 tenían niveles reducidos de m-rodopsina en comparación con las células cotransfectadas con m-rodopsina y el vector miARN de control. Además, los genes de UPR CHOP y BiP también estaban regulados a la baja en las células transfectadas con miR-708 en comparación con el control. Estos datos sugieren que el uso del andamio miR708 endógeno con expresión intrónica de miR708 proporciona un andamio alternativo que apoya el procesamiento y la expresión de miR708.

15 **Ejemplo 6: Comparación de diferentes andamios de miR-708**

20 Pueden ser beneficiosos niveles más bajos de expresión de miR-708 para reducir cualquier efecto potencial fuera de la diana del miARN en un entorno clínico. Por lo tanto, se analizaron diferentes andamios de miR para determinar la fuerza de expresión en la línea celular de retinoblastoma humano WERI.

25 25 La figura 14 representa niveles cuantificados de miR-708 en células WERI transfectadas con miR-708 dirigido por CBA, miR-708 dirigido por RK utilizando el andamio miR-155 que se muestra en la figura 4, o el vector RK miR-708 incorporado en intrón h-rodopsina que se muestra en la figura 12. La expresión de miR-708 en el sistema intrónico RK no era tan robusta como el sistema dirigido por CBA. Sin embargo, la expresión de miR-708 todavía se encontraba muy por encima del fondo y era aproximadamente 5 veces más baja que pRKmiR708 utilizando el andamio miR-155. Nótese que la h-rodopsina se coexpresó a partir de los vectores integrados en intrones, pero no en los vectores CBA o RK andamio miR-155.

30 30 A continuación, se compararon los niveles de ARNm de h-rodopsina en células WERI que expresan el vector de supresión/reemplazo miR-708 integrado en intrón o un vector miR-Control. La figura 15 muestra que las células WERI transfectadas con el vector de supresión/reemplazo miR-708 integrado en intrón tenían un nivel similar de h-rodopsina en comparación con las células transfectadas con el vector de control. Estos resultados indican que la expresión de h-rodopsina del vector de supresión/reemplazo, que carece de la secuencia diana de miR-708 UTR 3', es refractaria a la inhibición por la expresión de miR-708. Ambas células mostraron una mayor expresión de h-rodopsina que células WERI no transfectadas.

40 **Ejemplo 7: La atenuación de la rodopsina mutante por el vector de supresión/reemplazo miR-708 reduce un marcador de estrés del RE**

45 45 Se examinó la capacidad del vector de supresión/reemplazo miR-708 para reducir el estrés del RE en células que expresan rodopsina mutante. Las células WERI que expresan una rodopsina mutante P23H no glucosilada (N2K/N15K/P23H), con o sin una secuencia diana de miR708 UTR 3', se transfectaron con el vector de supresión-reemplazo descrito en la figura 12. Se recogieron las células y se extrajo el ARN para medir el ayuste de la proteína de unión a X-box (XPB-1). El XBP-1 es un factor de transcripción importante en la regulación de los genes de estrés del RE. Su ayuste es un marcador conocido de estrés del RE celular/UPR; las células sometidas a UPR muestran niveles aumentados de XBP-1 ayustado.

50 50 Como se muestra en la figura 16, las células que expresan rodopsina mutante con una secuencia diana UTR 3' habían disminuido el ayuste de XBP-1 cuando se transfectaron con el vector de supresión/reemplazo miR-708. Por el contrario, las células que expresan la rodopsina P23H mutante que carece de la secuencia diana de miR-708 UTR 3' tenían niveles equivalentes de ayuste de XBP-1 en comparación con las células transfectadas con la secuencia miR-Control. Estos resultados demuestran que la eliminación de la rodopsina mutante utilizando el vector de supresión/reemplazo miR-708 es eficaz para reducir el estrés del RE.

55 **Ejemplo 8: La expresión de miR-708 en el andamio de intrón de β -globina ubicado en la UTR 3' de rodopsina aumenta la expresión de rodopsina y miR-708**

60 60 Para evaluar si la posición del andamio miR-708 afecta a su expresión, se construyó un vector en el que la secuencia miR-708 (incluidas sus secuencias reguladoras/de procesamiento flanqueantes) se clonó en la secuencia de intrón de β -globina aguas abajo del ADNc de rodopsina, es decir, dentro de la UTR 3'. La figura 17 muestra un diagrama de este vector de supresión/reemplazo 3', que es similar al que se muestra en la figura 12, excepto que el andamio de intrón de β -globina humana miR-708 se encuentra en la UTR 3' del ADNc de rodopsina, en lugar de la UTR 5'.

65 65 Para determinar si la posición del andamio de intrón de β -globina humana miR-708 en el vector afectó a la expresión de miR-708 o h-rodopsina a partir del vector, las células WERI se transfectaron con el vector UTR 5' de la figura 12 o

el vector UTR 3' de la figura 17. La figura 18 muestra la expresión de h-rodopsina y miR-708 en estas células. Se encontró que el vector con el andamio miR-708 en la UTR 3' produce niveles más altos de h-rodopsina y ARN miR-708 que el vector que utiliza la configuración UTR 5'.

5 **Ejemplo 9: Evaluación del vector de supresión/reemplazo en un modelo de ratón P23H de degeneración retiniana**

10 Los constructos de supresión/reemplazo se evalúan en un modelo de ratón P23H de degeneración retiniana. En este modelo, la proteína P23H mutante expresada en células fotorreceptoras bastón induce estrés del RE/UPR, causando apoptosis y la muerte de las células bastón (Lee, E.S., *et al.* (2007) *FEBS Lett.* 581 (22): 4325-32) Despues de la muerte de células bastón se produce una muerte no autónoma de la célula de células cono.

15 El ratón P23H se trata con un vector AAV de supresión/reemplazo que expresa miR-708 y un gen de rodopsina humano refractario a la atenuación por miR708 (porque carece de una secuencia diana de miR-708). El vector de supresión/reemplazo da como resultado la atenuación de la rodopsina de ratón WT y P23H, pero el gen de rodopsina de reemplazo compensa la reducción en los niveles WT de la rodopsina. Por lo tanto, el vector proporciona la rodopsina de bastón necesaria para mantener la función y la integridad de las células bastón.

20 También se analiza un diseño de constructo de supresión/reemplazo alternativo. Tal como se muestra en la figura 19, este vector alternativo dirige la expresión de miR-708 del promotor RK y coexpresa h-rodopsina (refractaria a la atenuación por miR-708) utilizando el promotor de opsina de ratón.

25 Estos vectores de supresión/reemplazo también se analizan tal como se ha descrito anteriormente en un modelo de ratón P23H en el que el gen de m-rodopsina endógeno alberga un alelo de pérdida de función de copia única (por ejemplo, el ratón es heterocigoto con respecto a un alelo de inactivación (*knock out*) de m-rodopsina). Este modelo de ratón heterocigoto se puede construir utilizando técnicas genéticas de ratón estándar a partir de un ratón *mRho^{-/-}* y el modelo P23H descrito anteriormente. Sin desear vincularse a ninguna teoría, se cree que este modelo de ratón *mRho^{+/+}*-P23H, que contiene una copia del alelo mutante de h-rodopsina P23H y una copia del gen de ratón de tipo silvestre, puede parecerse a un genotipo de ADRP humano en el que los pacientes tienen copias iguales de los alelos de rodopsina de tipo silvestre y mutante.

30 **Ejemplo 10: Evaluación de vectores de supresión/reemplazo adicionales**

35 Se clonaron varios vectores que expresan tanto miR-708 (o una secuencia de miARN de control) como h-rodopsina a partir de un solo vector. Los vectores difieren entre sí en que las secuencias flanqueantes de la secuencia de miARN se derivan de miR-155 (tomado del sistema Invitrogen "Block-It") o de secuencias flanqueantes miR-708 5' y 3' endógenas. Las secuencias de miARN están integradas en el intrón h-β-globina aguas abajo del promotor de rodopsina quinasa y aguas arriba del ORF de h-rodopsina. El objetivo era evaluar si la expresión y el procesamiento de miARN son similares a partir de cada constructo. Un par adicional de vectores contenía las secuencias de miARN (control o miR-708) aguas debajo del ORF de h-rodopsina, también integrado en el intrón de β-globina. Solo los vectores que contienen las secuencias flanqueantes endógenas de miR-708 5' y 3' ubicadas aguas abajo del ORF de h-rodopsina se evaluaron en este experimento, las dos secuencias flanqueantes endógenas de miR-708 y miR-155 se evaluaron en los vectores en los que el intrón de β-globina se encuentra aguas arriba del ORF de h-rodopsina. Las células WERI se transfecaron con cada constructo y se determinaron tanto la expresión de miR-708 como la expresión de h-rodopsina.

40 Los resultados de la figura 20 indican que las secuencias flanqueantes de miR-155 generan una mejor expresión (o procesamiento de miARN) de miR-708 en comparación con las secuencias flanqueantes endógenas de miR-708. La expresión de miR-708 fue aproximadamente 10 veces mayor en aquellas células transfecadas con vectores que contienen las secuencias flanqueantes de miR-155 en comparación con las secuencias flanqueantes de miR-708. Los vectores que contenían secuencias flanqueantes de miR-708 tenían una menor expresión de miR-708 independientemente de si las secuencias se encontraban aguas arriba o aguas abajo con respecto al ORF de h-rodopsina. La expresión de h-rodopsina no se vio afectada por la sobreexpresión de miR-708, ya que sus niveles de expresión son aproximadamente iguales independientemente de la secuencia de miARN coexpresada en el vector. 45 La expresión de miR-708 no se detectó en vectores que contenían secuencias de miARN de control, tal como se esperaba.

50 **Ejemplo 11: Evaluación de vectores de supresión/reemplazo adicionales con una secuencia diana de miR-708 mutada**

55 Tal como se ha descrito anteriormente, se ha encontrado una secuencia de consenso correspondiente a un supuesto sitio diana de miR-708 en la UTR 3' de varios genes de rodopsina de mamíferos (Behrman, S. *et al.* (2011) *J. Cell Biol.* 192 (6): 919-27). Este ejemplo demuestra que una rodopsina con una secuencia diana de miR-708 mutada se puede utilizar en un vector de supresión/reemplazo.

Se construye un vector rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica miR-708 y un gen de rodopsina humana. El gen de rodopsina humana está mutado en la secuencia diana de miR-708 (SEQ ID NO: 19) por sustitución, delección o inserción de nucleótidos para reducir o prevenir el reconocimiento por miR-708. En algunos ejemplos, se elimina toda la secuencia diana de miR-708. En algunos ejemplos, la reducción o la prevención por miR-708 se mide con respecto al reconocimiento de miR-708 de una UTR 3' de rodopsina de tipo silvestre que comprende la secuencia diana de miR-708.

Para evaluar la supresión de la rodopsina autosómica dominante por miR-708 con la expresión concomitante de rodopsina de tipo silvestre, se transfecan células HEK-293 que expresan un gen de m-rodopsina mutante P23H que codifica una secuencia diana de miR-708 UTR 3' con un plásmido que expresa miR-708 y rodopsina humana con (CBA-miR-708-hRho-3'UTR⁻) o sin (CBA-miR-708-hRho-3'UTR⁺) una secuencia diana de miR-708 mutada. También se utiliza un miR-Control tal como se ha descrito en el ejemplo 2. Después de 72 horas, se recogen las células y se analiza la expresión de proteína rodopsina mP23H y rodopsina humana utilizando inmunotransferencia Western. La reducción de la expresión de la proteína m-rodopsina P23H en células transfectadas con el CBA-miR-708-hRho-3'UTR⁻ o el CBA-miR-708-hRho-3'UTR⁺ en comparación con las células transfectadas con un vector CBA-miR-Control indica actividad de miR-708. La expresión de rodopsina humana en células transfectadas con CBA-miR-708-hRho-3'UTR⁻ pero no CBA-miR-708-hRho-3'UTR⁺ indica que la rodopsina codificada por CBA-miR-708-hRho-3'UTR⁻ es refractaria a la supresión por miR-708.

20 Ejemplo 12: Supresión mediada por AAV de rodopsina endógena y expresión de rodopsina humana en la retina de ratón

Sobre la base de los experimentos descritos anteriormente, se realizaron experimentos adicionales para evaluar la estrategia de supresión/reemplazo de rodopsina en un ojo intacto. Este ejemplo demuestra la eficacia de un vector AAV de supresión/reemplazo construido utilizando un andamio miR-708 en la retina del ratón.

Se construyó una cápside AAV5 con un vector que porta el promotor de opsina específico de bastón, el andamio miR-708 (por ejemplo, las secuencias de andamio/flanqueantes endógenas de miR-708) y un gen de reemplazo de rodopsina humana. En una versión de este vector, la secuencia miR-708 (por ejemplo, la secuencia miR-708 que se une a la secuencia diana de miR-708) se insertó para dirigir la expresión de miR-708 en el contexto del andamio miR708 y el gen de reemplazo de rodopsina humana (AAV5OPSMiR708_{708hRHO}). En otra versión de este vector, se generó un vector de control que albergaba una secuencia de control de miR (AAV5OPSMiRcontrol_{708hRHO}). En ambos vectores, el gen de rodopsina humana de reemplazo fue refractario a la atenuación por miR-708 porque carece de una secuencia diana de miR-708. Ambos vectores se inyectaron por vía subretiniana en las retinas de ratones de tipo silvestre. Para cada ratón, el ojo sin tratar contralateral no se inyectó, y la expresión en cada retina inyectada se normalizó como veces de expresión en comparación con la retina contralateral no inyectada. Tres semanas después de la inyección, las retinas se recogieron y se analizaron para determinar los niveles de miR-708 (figura 21A), los niveles de ARNm de rodopsina de ratón (figura 21B) y la rodopsina humana (figura 21C).

40 La figura 21A muestra un aumento en niveles de miR-708 en la retina del ratón después de la inyección con el vector AAV5OPSMiR708_{708hRHO}, en comparación con el ojo sin tratar contralateral. Se midió una reducción significativa en la rodopsina de ratón en el ojo que recibió AAV5OPSMiR708_{708hRHO}, y no se midió ninguna reducción en la rodopsina de ratón en ojos que recibieron el vector de control, AAV5OPSMiRcontrol_{708hRHO} (figura 21B). Además, los niveles de rodopsina humana aumentaron hasta 100 veces en ambos vectores, en comparación con el ojo sin tratar contralateral sin inyectar (figura 21C). Estos datos demuestran que el vector AAV5OPSMiR708_{708hRHO} era eficaz *in vivo*.

50 En resumen, el vector de supresión/reemplazo optimizado AAV5OPSMiR708_{708hRHO} logró la atenuación de la rodopsina de ratón por miR-708 (la rodopsina endógena de ratón tiene una secuencia diana UTR 3') con expresión concomitante de la rodopsina humana de reemplazo, que era refractaria a la atenuación por miR708 (el gen de reemplazo de rodopsina humana carece de una secuencia diana de miR708 UTR 3'). Estos resultados muestran la eficacia de la estrategia de supresión/reemplazo en el ojo de mamífero intacto.

55 Ejemplo 13: Validación de vectores candidatos en células humanas

55 Se analizaron a continuación vectores candidatos basados en AAV5 para determinar su capacidad de promover miR-708 y la expresión de rodopsina humana en células humanas (HeLa).

60 Se analizaron dos promotores diferentes: la rodopsina quinasa (GRK1) y el promotor de opsina. El promotor de la rodopsina quinasa se describió anteriormente. El promotor de opsina (que se muestra en la SEQ ID NO: 22) contiene un fragmento de 676 pb que codifica un potenciador de CMV de 400 pb aguas arriba de la secuencia del promotor de opsina (-500 pb - + 15 pb). Además, se incluye una secuencia NRL de 65 pb; esto codifica un factor de cremallera básico de la retina neural (un factor de transcripción específico de fotorreceptores de bastón). Aguas abajo del constructo promotor se encuentra una secuencia de intrón híbrida del exón1 CBA y el virus diminuto de ratón (MVM), llamada secuencia de intrón MVM (que se muestra en la SEQ ID NO: 23). Un diagrama de este constructo promotor se representa en la figura 22.

Se utilizaron dos andamios diferentes: el andamio miR-155 o el andamio miR-708. Ambos se integraron en un intrón de beta-globina. En total, se sometieron a ensayo 4 vectores candidatos: AAV5GRK1miR708_155hRho (vector AAV5 con promotor de la rodopsina quinasa que dirige la expresión de miR-708 en un andamio miR-155 y rodopsina humana

5 menos la secuencia diana de miR-708; SEQ ID NO: 24), AAV5GRK1miR708_708hRho (vector AAV5 con el promotor de la rodopsina quinasa que dirige la expresión de miR-708 en un andamio miR-708 y la rodopsina humana menos la secuencia diana de miR-708; SEQ ID NO: 25), AAV5OPSMiR708_155hRho (vector AAV5 con el promotor de opsina que dirige la expresión de miR-708 en un andamio miR-155 y rodopsina humana menos la secuencia diana de miR-708; SEQ ID NO: 26) y AAV5OPSMiR708_708hRho (vector AAV5 con promotor de opsina que dirige la expresión de miR-708 en un andamio miR-708 y rodopsina humana menos la secuencia diana de miR-708; SEQ ID NO: 27). La figura 23A muestra la secuencia de miR-708 integrada en el intrón beta-globina. Los andamios miR-708 y miR-155 se muestran en las figuras 23B y 23C, respectivamente.

10 Cada uno de los 4 vectores AAV5 candidatos se utilizó para infectar células HeLa (utilizando el virus auxiliar AdTs149), y se midieron los niveles de miR-708 y h-rodopsina. Como se muestra en la figura 24, los cuatro vectores dieron como resultado la expresión de miR-708 y h-rodopsina en células humanas *in vivo*, en comparación con los vectores que dirigen la expresión de un miR de control desde el promotor de opsina o de rodopsina quinasa (Ops miR-Cont y RK miR-Cont, respectivamente). Estos resultados demuestran la validación exitosa de varios vectores que pueden utilizarse para estrategias de supresión/reemplazo (tales como las descritas anteriormente) en células humanas.

20 SECUENCIAS

Secuencia de nucleótidos de miR-708

AACTGCCCTCAAGGAGCTTACAATCTAGCTGGGGTAAATGACTTGCACATGAACACAACTAGACTG
TGAGCTCTAGAGGGCAGGGA (SEQ ID NO:1)

Secuencia de aminoácidos de rodopsina humana

MNGTEGPNFYVPFSNATGVVRSPFEYPQYYLAEPWQFSMLAAYMFLLIVLGFPINFLLYVTQHKK
LRTPLNYIILNLAVADLFMVLGGFTSTLYTSLHYFVFGPTGCNLEGFFATLGGEIALWSLVLAIE
RYVVVCKPMSNFRFGENHAIMGVAFWVMAHALACAAPPLAGWSRYIPEGLQCSRGIDYYTLKPEVNNE
SFVIYMFVVHFTIPMIIIFFCYQQLVFTVKEAAAQQQESATTQAKAEKEVTRMVIIMVIAFLICWVPY
ASVAFYIFTHQGSNFGPIFMTIPAFFAKSAIYNPVIYIMMNQFRNCMLTTICCGKNPLGDDEASA
TVSKTETSQVAPA (SEQ ID NO:2)

ADNc de rodopsina humana-UTR eliminada

ATGAATGGCACAGAACGGCCCTAACCTCTACGTGCCCTTCTCCAATGCGACGGGTGTGGTACGCAGCC
CCTTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCGCCTACATGTT
TCTGCTGATCGTGCTGGGCTTCCCCATCAACTCTCCTCACGCTTACGTCAACCGTCCAGCACAGAACAG
CTGCGCACGCCCTCAACTACATCCTGCTCAACCTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGGCCTAGGTG
GCTTCACCAGCACCCCTACACCTCTGCATGGATACTTCGTCTCGGGCCACAGGATGCAATT
GGAGGGCTTCTTGCCACCCCTGGCGGTGAAATTGCCCTGTGGTCTTGGTGGTCTGGCCATCGAG
CGGTACGTGGTGTGTAAGCCCATGAGCAACTCCGCTTGGGAGAACCATGCCATCATGGCG
TTGCCCTCACCTGGGTATGGCCTGGCGTGGCCGACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGGTACAT
CCCCGAGGGCCTGCAGTGTGGAAATCGACTACTACACGCTCAAGCCGGAGGTCAACAAACGAG
TCTTTGTATCTACATGTTCTGTGGTCCACTTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTCTGCTATG
GGCAGCTCGTCTTCACCGTCAAGGAGGCCGCTGCCAGCAGGAGTCAGCCACCACACAGAACAG
AGAGAAGGAGGTCAACCGCATGGTATCATGGTATCGCTTCTGATCTGCTGGGTGCCCTAC
GCCAGCGTGGCATTCTACATCTCACCCACCAAGGGCTCCAACCTCGGCTCCATCTGACCATCC
CAGCGTTCTTGCCAAGAGCGCCGCCATCTACAACCCGTCACTATATCATGATGAACAAGCAGTT
CCGGAACGTGATGCTCACCACTGCTGCGGCAAGAACCCACTGGGTGACGATGAGGCCTCTGCT
ACCGTGTCCAAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCC (SEQ ID NO:3)

ADNc de rodopsina humana-incluye UTR 3'

AGAGTCATCCAGCTGGAGCCCTGAGTGGCTGAGCTCAGGCCTTCGCAGCATTCTGGGTGGGAGCAG
 CCACGGGTCAGCCACAAGGGCCACAGCCATGAATGGCACAGAACGGCCCTAACCTACGTGCCCTTC
 TCCAATGCGACGGGTGGGTACGCAGCCCTTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGC
 AGTTCTCCATGCTGGCCCTACATGTTCTGCTGATCGTGGCTTCCCCATCAACTCCTCAC
 GCTCTACGTACCGTCCAGCACAAAGAAGCTGCGCACGCCCTCAACTACATCCTGCTAACCTAGCC
 GTGGCTGACCTCTCATGGTCTAGGTGGCTTACACAGCACCCCTACACCTCTGCACTGGATACT
 TCGTCTCAGGCCACAGGATGCAATTGGAGGGCTTCTTGCCACCCCTGGCGGTGAAATTGCCCT
 GTGGTCTTGGTGGCTGGCCATCGAGCGGTACGTGGTGTGTAAGCCCAGGCAACTTCCGC
 TTCGGGGAGAACCATGCCATCATGGCGTGCCTCACCTGGGTACGGCCTGAGTGCCTGTGAAATGACTA
 CCCCACTCGCCGGCTGGCCAGGTACATCCCCGAGGGCTGAGTGCCTGTGAAATGACTA
 CACGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTTGTCACTACATGTCGTGGTCCACTCACCATC
 CCCATGATTATCATCTTCTGCTATGGGAGCTCGTCTCACCGTCAAGGAGGCCGTGCCAGC
 AGCAGGAGTCAGCCACACAGAACAGAGAAGGGTACCCGCATGGTACATCATGGTCAT
 CGCTTCTGATCTGCTGGTGCCTACGCCAGCGTGGCATTCTACATCTCACCCACCAGGGCTCC
 AACCTCGGCCCCATCTCATGACCATCCCAGCGTCTTGCCAAGAGGCCCATCTAACACCCTG
 TCATCTATATCATGATGAAACAAGCAGTCCGAACTGCATGCTCACCCACATCTGCGGCAAGAA
 CCCACTGGGTGACGATGAGGCTCTGCTACCGTGTCAAGACGGAGACGAGGCCAGGTGGCCCGGCC
 TAAGACCTGCCTAGGACTCTGCCCCACTATAGGCTCTCCACCTACCTTCCCCAGCCA
 CAGCCATCCACCAGGAGCAGCGCTGTGAGAATGAACGAAGTCACATAGGCTCTTAATTTTTT
 TTTTTTTAAGAAATAATTAAATGAGGCTCTCACTCACCTGGGACAGCCTGAGAAGGGACATCCAC
 CAAGACCTACTGATCTGGAGTCCCACGTTCCCCAAGGCCAGCGGGATGTGCCCCCTCTCCCCA
 ACTCATCTTCAGGAACACGAGGATTCTGCTTCTGAAAAGTGTCCCAGCTAGGGATAAGTGTG
 TAGCACAGAATGGGGCACACAGTAGGTGCTTAATAATGCTGGATGGATGCAGGAAGGAATGGAGGA
 ATGAATGGGAAGGGAGAACATATCTATCCTCTCAGACCCCTCGCAGCAGCAACTCATCTGGCT
 AATGATATGGAGCAGTTGTTTCCCTCCCTGGGCCTCACTTCTCTCTATAAAATGAAATCCC
 AGATCCCTGGCCTGCCACACGCAGCTACTGAGAACACAAAGAGGTGTGTGTCTATGTGT
 GTGTTTCACTTGTAAATAGCAAGAAGCTGTACAGATTCTAGTTAATGTTGTGAATAACATCAA
 TTAATGTAACTAGTTAATTACTATGATTATCACCTCTGATAGTGAACATTTGAGATTGGCATT
 AGATGATGGGGTTCACCAACCTGGGGCAGGTTTAAATAGCTAGGCATCAAGGCCAGACC
 AGGGCTGGGGTTGGCTGTAGGCAGGGACAGTCACAGGAATGCAGAATGCAGTCATCAGACCTGAA
 AAAACAACACTGGGGAGGGGGACGGTGAAGGCCAAGTCCCAATGAGGGTGAGATTGGGCTGGGG
 TCTCACCCCTAGTGTGGGCCCCAGGTCCCGTGCCTCCCCCTCCCAATGTGGCTATGGAGAGACAG
 GCCTTCTCTCAGCCTCTGGAAGCCACCTGCTCTTGTCTAGCACCTGGTCCCAGCATCTAGAG
 CATGGACCTCTAGAACCATGTCACCCGCCACATTAAATTAACAGCTGAGTCCCTGATGTCATC
 CTTATCTCGAACAGAGCTAGAAACAAAGAGTGGGAAATTCCACTGGGCTACCTCCCTGGGATGTT
 CATGGGCCCAAGTTCCAGTCCCTGCCAGAACAGCCATCTCAGCAGTTGCTAGTCCATTCTC
 CATTCTGGAGAATCTGCTCCAAAAGCTGGCACATCTCTGAGGTGTCAGAATTAAGCTGCCCTCAGT
 AACTGCTCCCCCTCTCCATATAAGCAAAGCCAGAACAGCTAGCTTACCCAGCTGCTGGAGAC
 TAAGGCAAATTGGGCCATTAAAGCTCAGCTCTATGTTGGTATTAACGGTGGTGGGTTTGTGCT
 TTCACACTCTATCCACAGGATAGATTGAAACTGCCAGCTCCACCTGATCCCTGACCCCTGGGATGGC
 TGGATTGAGCAATGAGCAGGCCAAGCAGCACAGACTCCCTGGGCTAG
 AGGTGGAGGAGGCAGTCTGGGAATGGGAAAAACCCCA (SEQ ID NO:4)

Solo RK-miR708

GGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTGCTTCTCAGGGGAAAGTGAAGGCGGCCCTGGAGGAAGG
 GGCGGGCAGAATGATCTAATCGGATTCCAAGCAGCTAGGGGATTGCTTTCTAGCACCTTCTT
 GCCACTCTAAGCGTCTCCGTGACCCCGGCTGGGATTAGCTGGTGTGTCAGCCCCGGTCTC
 CCAGGGCTTCCAGTGGTCCCCAGGAACCCCTCGACAGGGCCGGTCTCTCTCGTCCAGCAAGGGCA
 GGGACGGGCACAGGCCAAGGGCGAGTCGCTGCACGCTGCCCTGCCCGTGCCTCGCCG
 CCGCCTCGCGCCGCCGCCGGCTCTGACTGACCGCTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGG
 CCTTCTCTCCGGCTGTAATTAGCCTGGTTAATGACGGCTTGTGCTTCTGTGGCTGCGT
 GAAAGCCTGAGGGGCTCGGGAGGGCCTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGGTGCCTGCGTGT
 GTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGCCTCGCGTGCCTGCCGGCGCTGTGAGCGCTGCCTGGCG
 CGGGGGCTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGGAGGGGAGCGCGGCCGGGGCGGTGCCCGCGTGC
 GGGGGGGCTGCGAGGGAAACAAAGGCTGCGTGCCTGGGGTGTGCGTGGGGGGTGAAGCAGGGGTG
 TGGCGCGTGGCTGGCTGCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCGCC
 TTGGGTGCGGGGCTCGTACGGGCCTGGCGGGGCTCGCGTGCCTGCCGGGGGGTGGCGGCAG
 GTGGGGGTGCCGGCGGGCGGGGCCCTCGGCCGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGCGCGCGGCC
 CCCGGAGCGCCGGCGGCTGCGAGGCGCGAGCGCAGCCATTGCTTTATGGTAATCGTGCAG
 GAGGGCGCAGGGACTTCTTGTCCAAATCTGTGCGAGCCAAATCTGGGAGGCGCCCGCACC
 CCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCCTGCCGGCAGGAAGGAATGGGGGGAGGGCTTC
 GTGCGTGCCTGCCCGCCGCTCCCTCTCCAGCCTCGGGCTGTCCGCCGGGGACGGCTG
 CCTCGGGGGGACGGGGCAGGGGGTCTGGCTCTGGCTGTGACCGCGCCCTAGAGCCTCT
 GCTAACCATGTTCATGCCTCTTCTACAGCTCTGGCAACGTGCTGTTATTGTGCTGT
 CTCATCATTTGGAAAGAATTCTCGAAAGATCTGGAGGCTGCTGAAGGCTGTATGCTGAAGGA
 GCTTACAATCTAGCTGGGGTTTGCCACTGACTGACCCAGCTAGTGTAAAGCTCTCAGGACACA
 AGGCCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCCA (SEQ ID NO:5)

RK-miR-708-op-rodopsina

CAATCTCCAGATGCTGATTGCGCAGGAACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGT
 TCATAGCCCATATATGGAGTCCCCGTTACATACTTACCGTAAATGGCCGCCCTGGCTGACCGCCC
 AACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCATAGGGACTTCC
 ATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT
 GCCAAGTACCCCCCTATTGACGTCATGACGGTAAATGGCCGCCCTGGCATTATGCCAGTACATG
 ACCTTATGGGACTTCCACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGTATTACCAAAATAGTT
 ATCGAGCCGCTGAGCCGGGGCGGGGGTGTGAGACTGGAGGCGATGGACGGAGCTGACGGCACAC

ACAGCTCAGATCTGTCAAGTGAGCCATTGTCAAGGGCTGGGACTGGATAAGTCAGGGGTCTCCTG
 GGAAGAGATGGGATAGGTGAGTTCAAGGAGGACATTGTCAACTGGAGCCATGTGGAGAAGTGAATT
 TAGGGCCCAAAGGTTCCAGTCGCAGCCTGAGGCCACCAGACTGACATGGGAGGAATTCCCAGAGGA
 CTCTGGGCAGACAAGATGAGACACCCTTCTTCTTACCTAAGGGCTCACCAGATGTCAACT
 TGGCCCTCTGCAAGCCAATTAGGCCCCGGTGGCAGCAGTGGGATTAGCGTTAGTATGATACTCGC
 GGATGCTGAATCAGCCTCTGGCTTAGGGAGAGAAGGTCACTTTATAAGGGCTGGGGGGTCACTG
 CCTGGAGTTGCGCTGGGAGCCGTCAGTGGCTGAGCTCAAGAGTAAGGGTTAACGGATGGTTGG
 TTGGTGGGTATTAATGTTAATTACCTGTTTACAGGCTGAAATCACTGGTTTAGGGTGTAC
 ATCTGCAGAATTCAAGCACCACCGCACAATGAATGGCACAGAAGGGCTAACCTACGTGCCCT
 CTCCAATGCACGGGTGTTGCTACGGCAGCCCCCTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGACCCATGG
 CAGTTCTCATGCTGGCGCCTACATGTTCTGCTGATCGTCTGGGTTCCCCATCAACTCCTCA
 CGCTCTACGTACCGTCCAGCACAAAGAAGCTGCGCACGCCCTCAACTACATCTGCTCAACCTAGC
 CGTGGCTGACCTCTCATGGCCTAGGTGGCTTACACGACCCCTACACCTCTGCATGGATAC
 TCGTCTCGGGCCCACAGGATGCAATTGGAGGGCTTCTTGCACCCCTGGCGGTGAAATTGCC
 TGTTGCTCTGGTGGCTGGCATCGAGCGTACGTGGTGTGTAAGCCATGAGCAACTTCCG
 CTCGGGGAGAACATGCCATCATGGCCTGCCTCACCTGGTATGGCGCTGGCTGCCGCA
 CCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGCCTGGTGAATCGACTACT
 ACACGCTCAAGCCGGAGGTCAACAAACAGAGTCTTGTATCTACATGTTCTGCTGGTCCACTCACC
 CCCATGATTATCATCTTCTGCTATGGCAGCTCGTCTCACCGTCAAGGAGGCCGCTGCCAG
 CAGCAGGAGTCAGCCACCACAGAACAGGAGGAGGTACCCGCATGGTCATCATGGTCA
 TCGCTTCTGATCTGCTGGTGCCTACGCCAGCGTGCATTCTACATCTCACCCACCAGGGCTC
 CAACTCGGCCATCTCATGACCATCCCAGCCTTGCACAGGCCATCTACAAACCC
 GTCATCTATATCATGATGAACAAGCAGTCCGAACTGCTCATGCTCACCACCATGCTGCCGCAAGA
 ACCCACTGGGTGACGATGAGGCCTCTGCTACCGTGTCCAAGACGGAGACGAGCAGGTGGCCCCGGC
 CTAACCAAGAAAGCTTAAGTTGTGTCGGCTTAGGGCTAAATGTCAGGACAGAACATGGAACACAT
 AGTAGCTGATTAATAAAATGCTAGCTGGATGAAGGGAGGAATGAGTGACTGACTGAGTGGATATG
 GTGAAGGGATTAATGGAAGGGAACATGGATGCTCAGGTGCCAACCTGGCAGATCCAGTCATGTC
 TGGCTGGAATCTATAAGCAGTTTACATACCTGCCCTGAGCTTATGCGGTAGTTATCACAGTTA
 AATTGCTAACCGAGTCAGTGCCTTGACACAAACAGTCTGAACTTAAGCTGAGTACTCTTAAAG
 GTAGCCTTGAGAACAGTGGCTGTGAGGCACTGGCAGGTAAAGTATCAAGGGTACAAGAACAGGTTAA
 GGAGACCAATAGAAACTGGCTTGTGAGACAGAGAAAAACCTAACCCCCATGGTGGCGAGGGACT
 GCTGTGTGAAATGGTAAGCTGCCCTCAAGGAGCTAACATCTAGCTGGGGTAAATGACTGACA
 TGAACACAAACTAGACTGTGAGCTCTAGAGGGCAGGGACCTTACCCCTAGTCATCTCTTCAACC
 TGCACACCCCTCCGTAGGGATCTCATGACTCTGCGTTCTGATAGGCACCTATTGGCTTACTGAC
 ATCCACTTGCCTTCTCCACAGGTGTCACCTCCAGTCACACGGCACATGAATGGCACAGA
 AGGCCCTAACTCTACGTGCCCTCTCAATGCGACGGGTGTGGTACGCAGCCCTTCGAGTACCC
 CAGTCAGAGATAATGACAGTGACAGCACGTCAGCTGCCAGCCCTAGACTGAGAACATCGAGA
 CCAGGGTCTCCGGCAAGGCCTAGGTCTCCCTCAGTATGGAACCTTGCCTCATGCTCTCAGCC
 TCCTGGCCTGTGGAGATCCAGCCCTTCTGGCTTCTGGATACATTGCTTCTACACCCAGCA
 ACCAACTGGCAACAGTCCAGGCCAGTGGAGTTTACAAGGCATGCCAATATGCCACCTTCAGG
 GAGCAGCTGAGTCCTGATGCCACCCCTGTTCTGAAGAGTTCAGAAACACAGTGCAAGACATGACCA
 GGCCTCATCTTAGGATGCTCATGGATCCAGTTCTAGCTCCCTGGATATGCTGTTCTTG
 GCCTTGGCTTTCTTATCCAGAGGGTTGGCTTAAGCCAACAGGAACATGGGGTACCA
 AATTGAGCAGCCTCAGTCTGCATCCTCTATAGAACACAGCTGGCCCTCAGCAGGCCAACT
 CTGCATGGGACAGAGGCATTAAAGC (SEQ ID NO:6)

RK-intrón-rodopsina-miR-708

GGCCCCAGAACGCTGGTGGTGTGTTCTCAGGGAAAAGTGAGGCAGGCCCTGGAGGAAGGGCCG
 GGCAGAATGATCTAATGGATTCCAAGCAGCTCAGGGATTGTCTTTCTAGCACCTTCTGCCACTCTAA
 GCGTCCTCCGTGACCCGGCTGGGATTAGCTGGCTGTGTCAGCCCCGGTCTCCAGGGCTTCCAGTG
 GTCCCCAGGAACCCCTGACAGGGCCCGTCTCTCGTCCAGCAAGGGCAGGGACGGGCCACAGGCCAAGGGC
 GGAGTCGCTGGAGCCTGCTTCCGGCTCCGGCCGCCCTGGCCGCCGGCCGGCTCTGA
 CTGACCGCGTAACTCCACAGGTGAGCGGGGGACGGCCCTTCTCCCGGGCTGTAATTAGCAAGAGGTAA
 GGTTTAAGGGATGGTTGGTGGGGTATTAATGTTAATTACCTGTTTACAGGCCTGAAATCACTGGT
 TTAGGTTGGGATCCGGTACCCATTGCCATGGCTAGCATGAGCTCCCTGCAGGGTTATCTGCAGA
 ATTGAGCACCACCGCACAATGAATGGCACAGAACGCCCTAACCTACGTGCCCTCCTAACATGCGACGGG

TGTGGTACGCAGCCCCCTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCATGCTGGCCGCC
TACATGTTCTGCTGATCGTGTGGCTTCCCCTCAACTTCTCACGCTTACGTACCGTCCAGCACAAGA
AGCTGCGCACGCTCTCAACTACATCCTGCTAACCTAGCCGTGGCTACCTCTTATGGTCTTAGGTGGCTT
CACAGCACCCCTACACCTCTGCAATGGATACTTCGTCTCGGGCCACAGGATGCAATTGGAGGGCTT
TTGCCACCCCTGGCGGTGAAATTGCCCTGTGTCCTGGTGTCTGGCCATGAGCGGTACGTGGTGGTGT
GTAAGCCATGAGCAACTCCGCTCGGGGAGAACCTGACATGGCGTGGCTTACCTGGGTCATGGC
GCTGGCCTGCGCCGACCCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCCCGAGGGCTCGAGTGTCTGTGGA
ATCGACTACTACAGCTCAAGCGGAGGTCAACAAACGAGTCTTGTCACTACATGTTGTTGTTCACTTCA
CCATCCCCATGATTATCATCTTCTGCTATGGCAGCTGTTACCGTCAGGAGGCCGTCAGC
GCAGGAGTCAGCCACACAGAAGGCAGAGAAGGGTCAACCGCATGGTCATCATGTCATGGTCATCGCTTTC
CTGAACTGCTGGGTGCCCTACGCCAGCGTGGCATCTACATCTTACCCACCAGGGCTCCAACCTGGTCCCC
TCTTCATGACCATCCCAGCGTTCTTGCCAAGAGCGCCCATCTACACCCCTGTCATCTATATCATGATGAA
CAAGCAGTCCGGAACTGCATGCTACCACCATCTGCTGGCAAGAACCCACTGGGTGACGATGAGGCCCT
GCTACCGTGTCAAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCGGCTAACCAAGAAAGCTTAAAGTTGTCTCCCGG
TTAGGGCTAAATGTCIAGGACAGAATGGAACACATAGTAGCTGATTAATTAATGCTAGCTGGATGAGGGAGG
AATGAGTGAAGTGAAGTGGATAATGAGTGAAGGGATAATGGAAGGGACATGGATGTCCTCAGGTGCCCC
AACCTGGCAGATCCAGTCATGCTGGCTGGAAATCTATAAGCAGTTTACATACATGCTGGCTGAGCTTATTGCG
GTAGTTTACACAGTTAAATTGCTAACGCACTGAGTCTGACACAAAGTCAGGACTTCAGTGCAGTGCAGT
ACTCTTAACTGAGCTGGCAGAAGTTGGTGTGAGGACTGGGACTGGCTGAGGACTAAGGTTACAAGACAGG
TTAAGGGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAAAACCTAACCCCATGGTGGAGGGACTG
CTGTTGTTGAAATGGTAACTGCCCCAAGGAGCTTACAACTAGCTGGGGTAAATGACTTGCACATGAACAC
AACTAGACTGTGAGCTCTAGAGGGCAGGGACCTTACCTAGTCATCTCTCACCCTGCACACCCCTCCC
TGAGGGATCTCATGACTCTTGTGTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTGCCTTCT
CCACAGGTGTCACCTCCAGTTACACCGGCACAATGAATGGCACAGAAGGGCTAACCTACGTGCCCTC
TCCAATGGCAGGGTGTGGTACGCAGCCCCCTCGAGTACCCACAGTCAGAGATAATGACAGTGACAGCAACG
TGAGCTGCAGCCCCCTAGGACTGAGAAAGCATGAGACAGGACAGGGTCTCCGGCAAGGCCTAGGTCTCCCTCAG
TATGGAACCTTGCCTCATGTCCTCAGGCCCTTGGCTTGTGAGATCAGGCCCTTCTTGTGGCTTCTGG
TACATTTGCTTCTCATACCCAGCAACCAAGTGGCACAGTGGCAGGCTATGGAGTTTAAAGGCCATGCC
AATATGCCACCTTCAAGGGAGCAGTGTGGCTTGTGACGCCCTTGTCTGAAGAGGTTCAAGAACACAGTGC
AAGACATGACCAAGGCCCTACCTTACGGATGCTCATGGATCAGTTCTTAACTGCCCTTGTGGATATGCTTT
TCTTGTGGCTTGGCTTTCTTATCCAGAGGGTTTGGCTTAAAGGCCAACAGGAACATGGGTACCA
AATTGACCAAGGCCCTCAGTGTGATCCCTCTCATAGAACACCACACTGGGCCCTCAGCAGGCCAACACTGCT
GGGGACAGAGGGATTAAAGC (SEQ ID NO: 7)

RK-miR-708-intrón hRho wt

GGGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTGTGCTCTCAGGGAAAAGTGAGGCGCCCTGGAGGAAG
GGGCGGGCAGAATGATCTAATCGGATTCCAAGCAGCTCAGGGATTGCTTTCTAGCACCTCT
TGCCACTCTAAGCGTCTCCGTGACCCCGGCTGGATTAGCTGGTGTGTCAGCCCCGGTCT
CCCAGGGCTTCCCAGTGGTCCCCAGGAACCCCTGACAGGGCCGGTCTCTCGTCCAGAAGGGC
AGGGACGGGCCACAGGCCAAGGGCACTAGAAGCTTATTCGGTAGTTATCACAGTTAATTGCTA
ACCGCAGTCAGTGTCTCTGACACAACAGTCTCGAAGCTTGAGCTGACTCTTAAGGTAGCCTT
GCAGAAGTTGGTCGTGAGGCAGTGGGAGGTAAGTACAAGGTTACAAGACAGGTTAAGGAGACCA
ATAGAAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAAAACCTAACCCCCATGGTTGGCGAGGGACTGCTGTG
TGAAATGTTAAGTGCCTCAAGGAGCTTACAATCTAGCTGGGGTAAATGACTTGCACATGAACACA
ACTAGACTGTGAGCTCTAGAGGGCAGGGACCTTACCCCTAGTCATCTCTTCAACCTGCACACC
CTCCCTGAGGGATCTCATGACTCTGCGTTCTGATAGGCACCTATTGGCTTACTGACATCCACTT
TGCTTCTCTCCACAGGTGTCACTCCAGTTACACCCGGCACAAATGAATGGCACAGAAGGCCCTA
ACTTCTACGTGCCCTCTCAATGCGACGGGTGTTGAGCTGCAGCCCTTCGAGTACCCACAGTACTA
CTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCGCTACATGTTCTGCTGATGTCGTTGGCTTC
CCCATCAACTTCTCACGCTCACGTCACCGTCCAGCACAAAGCTGCGACGCCCTCAACTACA
TCCTGCTCACCTAGCGTGGCTGACCTCTCATGGTCTTAGGTGGCTTACCCAGCACCCCTACAC
CTCTGCTGATGGTACTTCGTCCTGGGCCACAGGATGCAATTGGAGGGCTTCTTGCACCCCTG
GGCGGTGAAATTGGCTGTGGTCTTGGTGGCTGGCATCGAGGGTACGTGGTGTGTAAGC
CCATGAGCAACTTCCGTTGGGAGAACCATGCCATATGGCGTTGCCTCACCTGGGTATGGC
GCTGGCTGGCCCCACCCCCACTCCCCGGCTGGTCCAGTACATCCCCCAGGGCTGCAGTCTGG
TGTGGAATCGACTACTACAGCTCAAGCCGGAGGTCAACACGAGTCTTTGTCATCTACATGTTG
TGGTCCACTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTGCTATGGGCAGCTCGTCTCACCGTCAA
GGAGGGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGTCAGCCACACAGAAGGAGAGAAGGGAGGTACCCCGCATG

GTCACTCATCATGGTCATCGCTTCCCTGATCTGCTGGGTGCCCTAGCCAGCGTGGCATTCTACATCT
TCACCCCACCAGGGCTCCAACCTCGTCCCACCTTCATGACCATCCCGAGCGTTCTTGCCAAGAGCGC
CGCCCATCTACAACCCGTCTATATCATGATGAACAAGCAGTCCGGACTGCATGCTCACCACC
ATCTGCTCGGCAAGAACCCACTGGGTGACGATGAGGCTCTGCTACCGTGCTTCAAGACGGAGACGA
GCCAGGTGGCCCCGGCC (SEQ ID NO:8)

RK-intrón-miR-708-op-hRho wt

CAATCTCCCAGATGCTGATTCCAGGAACTAGTTATAATAGTAATCAATTACGGGTCTTACAGCTCAATGGGGTCTGGCTGACGCC
 TCATAGCCCCATATATGGAGTCCCGCTTACATAACTTACGGTAAATGGCCGCTGGCTGACGCC
 AACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCC
 ATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT
 GCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCGCTGGCATTATGCCACTACATG
 ACCTTAIGGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAAAATAGTT
 ATCGAGCCGCTGAGCCCCGGGGGCTGGGTGTGAGACTGGAGGCGATGGACGGAGCTGACGGCACAC
 ACAGCTCAGATCTGTCAAGTGAGGCATTGTCAGGGCTGGGACTGGATAAGTCAGGGGTCTCTG
 GGAAGAGATGGGATAGGTGAGTTCAAGGAGGACATTGTCAACTGGAGGCCATGTGGAGAAGTGAATT
 TAGGGCCCAAAGGTCCAGTCGCAAGGCCACTGACATGGGGAGGAATTCCAGAGGA
 CTCTGGGCAGACAAGATGAGACACCCCTTCTTACCTAAGGGCCTCCACCGATGTCACCT
 TGGCCCTCTGCAAGCCAATTAGGCCCGTGGCAGCAGTGGGATTAGCGTTAGTATGATATCTCG
 GGATGCTGAATCAGCCTCTGGCTTAGGGAGAGAAGGTCACTTATAAGGTCTGGGGGGGTAGTG
 CCTGGAGTTGCGCTGTGGGAGGCCAGTGGCTGAGCTCAAGAGGTAAGGGTTAAGGGATGGTTGG
 TTGGTGGGTATTAATGTTAATTACCTGTTTACAGGCTGAAATCAGTGGTTTAGGTTGGTAC
 ATCTGCAGAATTCAAGCCACCACCGCACAATGAATGGCACAGAAGGCCCTAACCTACGTGCCCT
 CTCAATGCACGGGTGTTACGCAGCCCCCTGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGG
 CAGTTCTCATGCTGGCGCCTACATGTTCTGCTGATCGTGTGGCTCCCCATCAACTCCTCA
 CGCTCTACGTACCGTCCAGCACAAGAAGCTGCGCACGCTCTCAACTACATCCTGCTCAACCTAGC
 CGTGGCTGACCTCTTCATGGCTTAGGTGGCTTACCGACCCCTCACACCTCTGCTGATGGATAC
 TTCGTCTCGGGCCCACAGGATGCAATTGGAGGGCTTGTGCCACCCCTGGCGGTGAAATTGCC
 TGTGGTCTTGGTGGTCTGGCCATCGAGCGTACGTGGTGTGTAAGCCATGAGCAACTCCG
 CTCGGGAGAACCATGCCATCATGGCGTGCCTCACCTGGCTATGGCGTGGCTGCCAGC
 CCCCCACTGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCCCGAGGGCTGCAGTGTGTTGGAAATGACTACT
 ACACGCTCAAGCCGGAGGTCAACAAACGAGTCTTGTCACTACATGTTGCTGTCACCTCACC
 CCCATGATTATCATCTTCTGCTATGGCAGCTCGTCCACCGTCAAGGAGGCCGTGCCCAG
 CAGCAGGAGTCAGCCACCACAGAAGGCAGAGAAGGGTCACCCGATGGTATCATGATGGTCA
 TCGTTTCTGATCTGCTGGTGCCTACGCCAGCGTGCATTCTACATCTCACCCACCAGGGCTC
 CAACTCGGCCATCTCATGACCATCCCAGCGTTCTTGCCAAGAGCGCCCATCTAACCC
 GTCATCTATATCATGATGAACAAGCAGTCCGAACTGCTGTCACCACCATGCTGCGGCAAGA
 ACCCACTGGGTGACGATGAGGCCTGCTACCGTGTCCAAGACGGAGACGAGCAGGTGGCCGGC
 CTAACCAAGAAAGCTTAAGTTGTCCGGCTAGGGCTAAATGCTAGGACAGAAATGGAACACAT
 AGTAGCTGATTAATAATGCTAGTGGATGAAGGGAGGAATGAGTGAATGACTGAGTGGATATG
 GTGAAGGGATTAATGGAAGGGAACATGGATGTCCTCAGGTGCCAACCTGGCAGATCCAGTC
 TGGCTGGAATCTATAAGCAGTTTACATACCTGCCCTGAGCTTATGCGGTAGTTATCAGTTA
 ATTGCTAACGCAGTCAGTGTCTGACACAAACAGTCTCGAACTTAAGCTGCAGTGA
 GTAGCTTGAGGTTGGCTGTGAGGCACTGGCAGGTAAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTAA
 GGAGACCAATAGAAACTGGCTTGTGAGACAGAGAAAAACCTAACCCCCATGGTGGCGAGGGACT
 GCTGTGTGAAATGGTAACTGCCCTCAAGGAGCTTACAATCTAGCTGGGGTAAATGACTGACA
 TGAACACAACACTAGACTGTGAGCTCTAGAGGGCAGGGACCTTACCCAGTCACTCTC
 TGACACCCCTCCCTGAGGGATCTCATGACTCTGCGTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGAC
 ATCCACTTGCCTTCTCTCCACAGGTGTCACCTCCAGTTCACACCGGACAATGAATGGCACAGA
 AGGCCCTAACCTCTACGTGCCCTCTCCAATGCGACGGGTGTGGTACGCAGCCCTCGAGTACCC
 CAGTCAGAGATAATGACAGTGACAGCACGTCAGCTGCAGCCCTAGGACTGAGAAAGCATGAGA
 CCAGGGGTCTCCGGCAAGGCCCTAGTCAGTATGGAAACCTTGCCTCATGTCTCAGCC
 TCCTGGCCTGTGGAGATCCAGGCCCTTGGCTCTGGATACATTGCTTCTACACCAGCA
 ACCAAGTGGCAACAGTCCAGGCCAGTATGGAGTTAGAAGCCATGCCAATATGCCACCTCAGG
 GAGCAGCTGAGTCCCTGATGCCACCTTGTGAAGAGTTAGAAACACAGTGCAAGACATGACCA
 GGCCTCATCCTTAGGATGCTCATGGATCCAGTCTTAGCTCCCTTGTGGATATGCTGTTCTTG
 GCCTTGGCTTTCTTATCCAGAGGGTTTGGCTTAAGGCCAACAGGAACATGGGGTACCA
 ATTGAGCAGCCTCAGTCATCCCTCTATAGAACCCACAGCTGGGCCCTCAGCAGGCCAACT
 CTGCATGGGACAGAGGCTTAAAGC (SEQ ID NO:9)

Intrón quimérico

GGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCCGCCCTCGGCCGCCCGGGCGGGCGCTGTAATT
 CTCGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATT
 ACGCCTGGTTAATGACGGCTTGTCTTCTGTGGCTGCGTGAAGCCTTGAGGGGCTCGGGA
 GGGCCCTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGTGCGTGCCTGTGTGAGCGCTGCGGGCGCGCCTTGTGCGCTCCGCA
 TGCGGCTCCGCGCTGCCCGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGCCTTGTGCGCTCCGCA
 GTGTGCGGAGGGAGCGGGCGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGCTGCGAGGGGAACAA
 AGGCTGCGTGGGGTGTGCGTGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGCGCGTGGTGGCTGCAA
 CCCCCCTGACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGCCGGCTCGGTGCGGGCTCCGTACGG
 GCGTGGCGGGCTGCCGTGCCGGGGGTGGCGCAGGTGGGGTGCCTGGGGCGGGCGGG
 GCCGCTCGGGCGGGAGGGCTCGGGGGAGGGCGCGGCCCGAGCGCCGGCTGCGA
 GCGCGGCGAGCCATTGCTTTATGTAATGTCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCCTTGT
 CCAAATCTGCGGAGCCAAATCTGGAGGGCGCCACCCCCCTAGCGGGCGGGCGAA
 GCGGTGCGGGCGCCGGAGGAAGGAAATGGGGAGGGAGGGCTTGTGCGTGCCTGGCGCCGTC
 CTCTCCCTCCAGCCTCGGGCTGTCCCGGGGGAGGGCTGCTCGGGGGAGGGCAGGG
 CGGGGTICGCTTCTGGCTGTGACCGCGGCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTATGCCCTTCTT
 CTTTCCCTACA (SEQ ID NO:10)

Secuencia de relleno

AGCTTGAATGCCACCTCCTGATATTCTAGGTGTCCTGGAAGCCTGCTCATCTTGCCCTGAG
 TTTGGGTACCTGGCCCCAGCCTGTAACATCCCCAGGGCCCTACACCCAGAGAAACACGGGGCTG
 GTGGCAGTGCCAGTGACAACCGTTAGTGGATAAGAGAAGAGTGACCACACCAGGCTGAGTGTCC
 TCTCTGGTTTCCATGGGAGACAATGCCACCTGAGCAGGGCTGGTGTAGCGGGCAGCTGGCT
 GGGCTCTGATCCGTTACCTCTCAGCCTTTCTCAACCCCTGGAGCAGAGACCTCAG
 GAGGTGCTGGCATGGAACAGAGAAATTCCAGCCTCGATCCCTATTATGAAACCCGACACCTTGTAT
 TTTCATCTGGTTTACAGTGTACAAACGAACTAGATCAGCAGGGCATGGCATAATCAGAATGC
 ACACACATACTAATGTGTGGCTATGTTAAGTATCACTACTACAGGACACCAATCTAACAGC
 ACCGATAAAAGTGACAGAGAAACGCAAGCCTCTGCGAACATGGCTGGCTGTTCCAATTCCGAACCT
 TGCTTTCTGGCCTGCCACACAGGCTTCTCCCCCAGGGACATTCTACCCCTGAACTC
 CACACTCCACTGCTGCCCTGGCAAGGCCATCTGTTCTTTGGTCTGCCAGAACGTGTGGT
 GGTGCTGCTGCCCTGCTGGCACTGGATATTGGGAAGGGACAGTGTCCACACTGGAGTGGGAAG
 TTCCCAAGGAGACCTTACCTCTCACCTGGTACTGTTCTCTCATGGAGCATTGGACGGCGC
 TGCCTGAACTCAGTGGTGGCCTCATCTGGAAAGCCAAGTTATACAGAGTAGCAGTGACCCAGGGAT
 GTGGGGTTCACCCCTCAGCCCTCTGCCAGTCCTGATGGCCTCAGTCCAAACATGGCTAACAGGG
 TGTTGGCAGCTTGTGGCACCCCTCAGGTTGGGAATCACCTCTGTCCTICATTTCAGGAACCTG
 GTGATGATACTGTTGGTGGAGTTACCTACAGGCTGCTGTAGTTCCCTCATCAGGAGGAAGAAGA
 TGGCGGTGGATTGCCAGGTATTTCATCAGCAGCACCCAGCTGGACAGCTTCTACAGTGTGGAT
 GTAAACATGCCCTAAACGCTTCATCATAGGCACCTTCAGGTGGTCACTGGTCCACGTGGAACTCC
 TCTTCCTCGGTGCTCTGACTCAAAGGGTCTCTCCATTGCTGGAGAGAGGGGAAGGTGGCAT
 CACCAGGGTGAGTGAAGGTTGGAAAGAGTGAGCAGAAATAAGAAACCATGAGTCCCCCTCCCTGAGA
 AGCCCTGAGCCCCCTGACGACACACATCCCTGAGGCTCAGCTCATCTGTAAAAGGTGCTGA
 AACTGACCATCCAAGCTGCCAAAAAGATTGTTGGGATAATTCAAACACTAGAGGAAGATGCAGAA
 TTTCTACATCGTGGCGATGTCAGGCTAAGAGATGCCATCGTGGCTGTCATTGGAATCATA
 TGTGTTATITGAGGGTGCTTGGATATTACAAATAAAATGTTGGAGCATCAGGCTATTTGGTACCTT
 CTGCTAAGGCTCCCTGCCCTGTTAATTGGCAGCTCAGTTATTCTACCCAGGGAAACATTCTGCT
 TACTATTCTGAGAGCTTCCCTACCTCTAGATTGGCAGGGGAAATGCAAGATGCCCTGAGCAGCCTC
 CCTCTGCCATACCAACAGAGCTCACCATCGAGGCTGAGAGTGGACAGGGGCTCAGGGACCC
 TGATCCCACTTCTCATGGACAGAAGGGAGACTGGGCTGGAGAGGGACCTGGGCCCCCACTA
 AGGCCACAGCAGAGCCAGGACTTAGCTGTGACTGCAGCCTGGCTTGCCTCACTGCCCTC
 TGCCTCAAGAGCAAGGGAGCCTCAGAGTGGAGGAAGCAGCCCTGGCCTTGCCTCCACCTCCC
 CCCTATGCTTTCTGGGACAGTGGGAGCTGGCTTGAATGCCCTGGGCCCCCAGGACCCCTGGC
 ATTTAACCCCTCAGGGCAGGAAGGCAGCCTGAGATAACAGAAGAGTCCATCACCTGCTGTATGCCA
 CACACCACCCCCACAGTTACCTACTAGT (SEQ ID NO:11)

pCBA-h-rodopsina-miR708 (andamio miR-155)

GAATTGGGACCGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT
 CATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTACGGTAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCA
 ACGACCCCCCGCCCATTGACGTCAAATATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCA
 TTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAAACTGCCCCTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATG
 CCAAGTACGCCCTATTGACGTCAAATGACGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGA
 CCTTATGGGACTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCAGGT
 GAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTGGTATTATTT
 ATTGTTAATTATTTGTGCAGCGATGG
 GGCAGGGGGCGAGGGGCGGGGCGAGGGCGAGGGTGCAGGCCAATCAGAGCGGCGCCT
 CCGAAAGTTCTTTATGGCGAGGCGGGCGGGCGGGCCCTATAAAAGCGAAGCGCCGGCG
 GCGGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCCTCGCCCCGTGCCCTCGCCGCCGCTCGGCCGCCCCGCC
 CCGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCCACAGGTGAGCGGGGGACGGCCCTCTCCTCCGGGCTGT
 AATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTGTTCTTCTGTGGCTGCGTGAAGGCTTGAGGGGCTCC
 GGGAGGGCCCTTGTGGGGGGAGCGGGCTGGGGGGTGCAGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCG
 CGCGTGCCTCGCGAGGGGAGCGCGCCGGGGCGGTGAGCGCTGCCCGGGTGCAGGGGGGCTGCGAGGG
 ACAAAAGGCTGCGTGCAGGGGTGTGTGCGTGGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGCGCTCGGTGCG
 GCAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCGCTTCGGGTGCGGGCTCCGT
 ACAGGGCGTGGCGCGGGGCTGCCGTGCCGGGGGGTGGCGCAGGTGGGGGTGCCGGGGGG
 CGGGGCGCTCGGGCGGGGAGGGCTGGGGGGAGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 TCGAGGCGCCGAGCCGAGCCATTGCTTTATGGTAATCGTGCAGAGGGCGCAGGGACTTCC
 TTGTCCTAACATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGACCCCCCTCTAGCGGGCGGG
 CGAAGCGGTGCGGCCGGCAGGAAGGAAATGGCGGGGGAGGGCCTCGTGCCTGCCGCCG
 TCCCCCTCCCTCTCCAGCCTCGGGCTGTCGCCGGGGGAGGGCTGCGCTGCCCTGGGGGG
 AGGGCGGGGGTTCGGCTCTGGCGTGTGACCGGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACATGTT
 TCTCTTTCTACAGCTCTGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCATCATTTGGCAAAGA
 ATTCTCGAAAGATCTGCTAGCTTAATTAAACCAAACGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCACTG
 TGCTGGATATCTGCAAACTCAGCCACCACGGGACAATGAATGGCACAGAACGGCCCTAAC
 GTGCCCTCTCCAATGCGACGGGTGTGGTACCGAGCCCTTCAGTACAGGACTAACCTGGCT
 AGCCATGGCAGTTCTCATGCTGGCGCCTACATGTTCTGCTGATCGTGCCTGGCTCCCC
 CTTCCCTCACGCTCACGTCACCGTCCAGCACAGAACAGCTGCGCACGCCCTCAACTAC
 AACCTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGGCTTAGGTGGCTCACAGCACCCCTACAC
 ATGGATACTCGTCTCGGGCCACAGGATGCAATTGGAGGGCTCTTGCCACCCCTGGCG
 AATTGCCCTGTGGCCTTGGTGGCTGCCATGAGCCGTACGTGGTGTGTAAGGCCATGAGC
 AACCTCCGCTCGGGGAGAACATGCCATGGCGTTGCCCTCACCTGGGTGATGGCGCTGGC
 GCGCCGACCCCACTCGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCCCGAGGGCCTGCAGTGC
 CGACTACTACACGCTCAAGCCGGAGGTCAACAAACGAGTCTTGTGATCTACAT
 TTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTCTGCTATGGCAGCTGCTTCAACCGTCAAGGAG
 CGCAGCAGCAGGAGTCAGCCACCACACAGAACAGAGGAGGTGACCCGATGGTC
 CATGGTCATCGCTTCTGATCTGCTGGGTGCCCTACGCCAGCGTGGCATTCTAC
 ATCTCACCCAC
 CAGGGCTCCAACCTCGGTCCCATCTTCATGACCATCCAGCGTCTTGC
 AACACCCCTGTCATCTATATCATGATGAAACAAGCAGTCCCGA
 ACTGCATGCTCACCA
 CGGCAAGAACCCACTGGGTGACGATGAGGCCTCTGCTACCGTGT
 CCAAGACGGAGACGAGCCAGGT
 GCCCTATTCTATAGTGT
 CACCTAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGT
 GCCTTCTAGTT
 CCAGCCATCTGTTGCTGCCCTCCCCGTGCCCT
 CTTGACCCCTG
 GAGGTGCCACT
 CCCACTGTC
 CTTTCTA
 TAAATGAGGAAATTG
 GCATCGCATTG
 TCTGAGTAGGTG
 TCAATTCT
 TGGGGGTG
 GGGTGGGGCAGG
 ACAGCAAGGGGAGG
 ATTGGAAG
 ACAATAGC
 AGGCATG
 CTGGGGAG
 CTAGAGTC
 GACCCG
 ATGGT
 GAAATTG
 TTATCCG
 CTACA
 ATTCC
 ACAC
 ACA
 AC
 ATG
 GAG
 GGG
 GCTAA

TGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCGCTTCCAGTCGGAAACCTGTCGT
 GCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGGCGGTTGCGTATTGGCGCTTCCGT
 ATTAGTCATCGCTATTACCATGGTATGCGGTTTGGCAGTACATCAATGGCGTGGATAGCGGTT
 GACTCACGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTAATGGAGTTGTTGGCACCAAAATC
 AACGGGACTTCCAAAATGCGTAACAACCTCCGCCATTGACGAAATGGCGGTAGGCGTACG
 GTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTGGTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTATCGAA
 ATTAATACGACTCACTATAGGGAGTCCAAAGCTGGTAGTTAACAGTATCAACAAGTTGTACAAAAA
 AGCAGGCTTAAAGGGAGGTAGTGAAGTCGACCAGTGGATCCTGGAGGCTTGCTGAAGGCTGTATGCT
 GAAGGAGCTACAATCTAGCTGGGTTTGGCACTGACTGACCCAGCTAGTGAAGCTCCTCAG
 GACACAAGGCTGTTACTAGCACTCACATGGAACAAATGGCCAGATCTGGCCCACTCGAGATGCT
 TCTCGCTCACTGACTCGCTGCCCTCGGTCTGGCTCCGGCAGCGTATCACCTCACTCAAAGG
 CGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCA
 AAAGGCCAGAACCGTAAAAGGCCGCTGGCTTCCATAGGCTCCGGCCCTGACGAG
 CATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGGCGAACAGGACTATAAGATAACAGGCGT
 TTCCCCCTGGAAGCTCCTCGTGGCTCTCTGTGACGACCCCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGC
 CTTCTCCCTCGGAAGCGTGGCCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTCCGGTAG
 GTCGTCTCGCTCCAAGCTGGCTGTGACGAACCCCCCGTACGGCCGCTGCGCCTATCCG
 GTAATATCGCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACAGACTTATGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAA
 CAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGAGCGGTCTACAGAGTTCTGAAAGTGGTGGCCTAACTACGGC
 TACACTAGAAGGACAGTATTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGGCCAGTTACCTCGGAAAAAGAGTTG
 GTAGCTCTGATCCGGCAAACAAACCCACCGCTGGTAGCCGGTTTTGTTGCAAGCAGCAGAT
 TACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTGATCTTACGGGCTGACGCTCAGTGG
 AACGAAAATCACGTTAAGGGATTGGTATGAGATTCAAAAGGATCTCACCTAGATCCTT
 TAAATTAAAAATGAAGTTAAATCAATCTAAAGTATATGAGTAAACTGGTCTGACAGTTACCA
 ATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTCGTCATCCATAGTTGCCTGACTC
 CCCGTCGTGAGATAACTACGATAACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCAAGTGTGCAATGATACC
 GAGACCCACGCTCACCGCTCCAGATTACAGCAATAACCAGCCAGCCGGAAAGGCCAGCGCAG
 AAGTGGCTTGCAACTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTCGCGGAAAGCTAGAGTAAGT
 AGTCGCCAGTTAATAGTTGCGAACGTTGCTCATGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGT
 CGTTGGTATGGCTCATTGAGCTCCGGTCCACGATCAAGGCAGTTACATGATCCCCATGTT
 GTGCAAAAAGCGTTAGCTCCTCGGTCTCGATCGTGTAGAAGTAAGTGGCCGAGTGT
 TCACTCATGTTATGGCAGCACTGCTACATTCCTACTGTCTGCTCATCCGTAAGATGCTTCTG
 TGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTGCC
 GCGTCATAACGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACCTTAAAGTGTCTCATATTGAAAACGT
 TCTCGGGCGAAAATCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCG
 CACCCAACTGATCTCAGCATCTTACTTACCCAGCGTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCA
 AAATGCCCAAAAAGGGAATAAGGGCAGACCGAAATGTTGAATACTCATACTCTCCTTTCAA
 TATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCATGAGCGGATACATATTGATGTTAGAAAA
 ATAAACAAATAGGGGTTCCCGCAGATTCGGGAAAGTGCACCTGACGCTAAGAACCAATTAT
 TATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTACCGAGGCCCTTCTGCTCGCGCTTCCGGT
 GACGGTGAACACCTCTGACACATGCGACTCCGGAGACGGTCACAGCTGCTGTAAGCGGATGCC
 GGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGGGTGTGCGGCTTAACTATGC
 GGCATCAGAGCAGATTGACTGAGAGTGCACCATATGCCGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGG
 AGAAAATACCGCATCAGGCCATCGCCATTGCGCAACTGTTGGAAAGGGCAGTCGGTGC
 GGGCCTCTCGTATTACGCCAGCTGGCAAAGGGGATGTGCTGCAAGGCAGTTAAGTGGTAAC
 GCCAGGGTTTCCAGTCAGCACGTTGAAACAGACGGCCAGT (SEQ ID NO:12)

Andamio miR155

GATCCTGGAGGCTGCTGAAGGCTGTATGCTGAAGGAGCTTACAATCTAGCTGGGTTTGGCCACT
 GACTGACCCAGCTAGTGTAACTCCTTCAGGACACAAGGCCTTACTAGCACTCACATGGAACAA
 ATGGCCAGATCTGGCCGAC (SEQ ID NO:13)

5

Andamio endógeno miR708

AACCTAACCCCCATGGTGGCGAGGGACTGCTGTGTGAAATGGTAACGCCCTCAAGGAGCTTAC
 AATCTAGCTGGGGTAAATGACTGACATGAACACAACAGACTGTGAGCTTCTAGAGGGCAGGGA
 CCTTACCTAGTCATCTCTCACCTGCACACCCCTCCGTAGGGATCTCAT (SEQ ID
 NO:14)

10

pRK-h-rodopsina-miR-708 (miR708 en el andamio endógeno miR708, ubicado en la UTR 3' de h-rodopsina)

TCGTTTACAACGTCGTGACTGGGAAACTGCTAGCTGGATCTTGTGAAGGAACCTACTTCTG
 TGGTGTGACATAATTGGACAAACTACCTACAGAGATTAAAGCTAAAGTAATATAAAATTTA
 AGTGTATAATGTGTTAAACTAGCTGCAAAACCTGTGCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGCC
 CCTCCCCCGTGCCTTCCTGACCCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTCTAATAAAATGAGGA
 AATTGCATCGCATTGTCGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGTGGGTGGGCAGGACAGCAAG
 GGGGAGGATGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGAACTAGTCGGACCGCTGCAGGCATGCAAGC
 TTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTCTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATTCCACACAACA
 TACGAGCCGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAATTGC
 GTTGCCTCACTGCCCCCTTCCAGTCGGAAACCTGTCGTCGCCAGCTGCATTAATGAATCGCCAA
 CGCGCGGGAGAGGGCGTTGCGTATTGGCGCTCTCCGCTCGCTCACTGACTCGTGC
 CGTCGTTCCGCTCGCGCAGGGTACAGCTCAAAAGGGGTAATAACGGTTATCCACAGAAC
 AGGGATAACCGCAGGAAAGAACATGTGAGCAGAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCC
 GCGTTGCTGGCTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTC
 AGAGTGGCAGAACCCGACAGGACTATAAAGATACCGAGCCTTCCCTGGAGCTCCCTCG
 CTCTCTGTCGACCCCTGCGCTACCGGATACCTGTCGGCTTCCCTCGGAAGCGTGGCG
 CTTCTCATAGCTACGCTGAGGTATCTCAGGCTCGGTAGGCTCTCGCTCAAGCTGGCTTG
 TGACGAACCCCCGTTAGCCCACCGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTTATGTA
 GCGCGTCTACAGACTTCTGAGGCTAACACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTGGTA
 TCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAGAGTTGGTAGCTCTGATCCGGCAAACAAAC
 CACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTAA
 GAAGATCCTTGTATCTTCTACGGGCTGACGCTCAGTGGAACGAAACTCACGTTAAGGGATT
 TGGTCATGAGATTATAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTAAATTAAAAATGAAGTTAAATC
 AATCTAAAGTATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATC
 TCAGCGATCTGCTATTGCTTACCCATAGGCTGACTCCCCGTCGTAGATAACTACGATAC
 GGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTCAATGATACCGCAGACCCACGCTCACCGCTCCAGA
 TTTATCAGCAATAACCAAGCCAGCCAGGCGAGCGCAGAAGTGGCTCTGCAACTTATCGCC
 TCCATCCAGCTATTAAATTGTTGCCGGAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTGCGCA
 ACGGTTGCTGCAAGGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTGTGGTATGGCTTATTAGCTCAGCTC
 CGGTTCCCAACGATCAAGGCAGTTACATGATCCCCATGTTGCAAAAAAGGGTTAGCTCCTC
 GGTCTCCGATCGTGTCAAGTAAGTGGCGCAGTGTATCACCATGGTTATGGCAGCACTGC
 ATAATTCTCTACTGTCATGCCATCGTAAGATGCTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTC
 ATTCTGAGAATAGTGTATGCGCGACCGAGTTGCTCTGCCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCG
 CCACATAGCAGAACCTTAAAGTGTCTCATATTGAAAACGTTCTCGGGCGAAAACCTCAAGGA
 TCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTGTCAACCAACTCGTCACCCACTGATCTTCAGCATCTT
 TACTTCACCAGCGTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAATGCCGCAAAAAGGGATAAGG
 GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTCCTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTT
 ATTGTCATGAGCGGATACATATTGAATGTTAGAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCAC
 ATTTCGGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAT
 AGGCATACGAGGCCCTTCGCTCGCGGTTGGTGTACGCGTGAAGGGTCAACATGC
 AGCTCCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCG
 GTCAGCGGGTGTGGGGGTGTCGGGCTGGCTTAACATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGA
 GTGCACCA (SEQ ID NO:15)

Secuencia de intrón de β-globina

ACTAGAAGCTTATTGGCTGAGTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCACTCAGTGCTCTGACACAA
 CAGTCCTGAACCTAACGCTGAGTCACAGCTCTTAAAGGTAGCCTGAGAAGTTGGCGTGGAGGCACTG
 GGCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGACA
 GAGAATGGATCCTGGAGGCTTGTGAAGGCTGTTAGGAGCTTACAATCTAGCTGGGTT
 GGCCACTGACTGACCCAGCTAGTGTAAAGCTCTCAGGACACAAGGCCTGTTACTGACTCACAT
 GGAACAAATGGCCAGATCTGAGACTCTGCGTTCTGATAGGCACCTATTGGCTTACTGACATCC
 ACTTGCCTTCTCCACAGGTGCACTCCAGTTCA (SEQ ID NO:16)

5

Secuencia de miR708 en un andamio miR155

TGGATCCTGGAGGCTGCTGAAGGCTGTTAGCTGAAGGAGCTTACAATCTAGCTGGGTTTGGCCA
 CTGACTGACCCAGCTAGTGTAAAGCTCTCAGGACACAAGGCCTGTTACTGACTCACATGGAAC
 AAATGGCCAGATCTG (SEQ ID NO:17)

Secuencia de miR708 en un andamio nativo

AAACCTAACCCCCATGGTGGCGAGGGACTGCTGTTGAGGAAATGGTAACGCCCCCTAACGGAGCTTA
 CAATCTAGCTGGGGTAATGACTTGCACATGAACACAACACTAGACTGTGAGCTCTAGAGGGCAGGG
 ACCTTACCTCTAGTCATCTCTCACCCTGACACCCCTCCGAGGGATCTCAT (SEQ ID
 NO:18)

10

Diana de miR-708 de rodopsina humana de UTR 3'

CUCUGCCUGGAGACUAAGGC~~AAAU~~GGCCAU~~AAA~~AGCUCAGCUCCUAUGUUGGU~~AAU~~ACGGUGGU
GGGUUUUUGUUG (SEQ ID NO:19)

ITR de AAV mutada

CCACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCGGC
TTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGCAGAGAGGG (SEQ ID NO:20)

5

Secuencia ITR de tipo silvestre

GGCCACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGGTCGCCGACGCCGG
GCTTGGCCGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGCAGAGAGGGAGTGGCAACTCCATCACTAGG
GGTCCCT (SEQ ID NO:21)

Promotor de opsina

TGCTGATTGCCAGGA~~ACTAGT~~TATTAA~~TAGT~~AA~~TCA~~TTACGGGTCATTAGTT~~CATAG~~CCATAT
ATGGAGT~~TC~~CGGTTACATAACT~~TACGGT~~AA~~TGGCCC~~CTGGCTGACGGCCAA~~CGAC~~CCCCGGCC
ATTGACGTCAATA~~ATGACG~~T~~ATG~~T~~CCC~~ATAGTAACGCCAATAGG~~GACT~~TTCCATTGACGTCAATGGG
TGGAGT~~ATT~~TACGGTAA~~ACT~~GCCC~~ACT~~TGGCAGTACATCAAGTGT~~TAT~~GCA~~AGT~~TACGCCCT
ATTGACGTCAATGACGGTAA~~ATGGCCC~~CTGGCATT~~AT~~TACGCCAGTACATGACCTT~~ATGG~~ACT~~TT~~CC
TACTGCCAGTACATCTAC~~G~~TATTAGTCATCGCTATTAC~~CACAA~~ATAGTT~~TAT~~CGAGCCGCTGAGCCGG
GGGGCGGGGGGTGTGAGACTGGAGGCATGGACGGAGCTGACGGCACACAGCTCAGATCTGTCAAG
TGAGCCATTGTCAGGGCTTGGGACTGGATAAGTCAGGGG~~TCT~~CTGGGAAGAGATGGGATAGGTGA
GTTCA~~GGG~~AGGAGACATTGTCAACTGGAGCCATGTGGAGAAGTGAATTAGGGCCAAAGGTTCCAGTC
GCA~~GG~~CTGAGGCCACCAGACTGACATGGGAGGAATTCCAGAGGACTCTGGG~~CAG~~ACAAGATGAGA
CACCC~~TT~~CTT~~TT~~TTAC~~TA~~AGGGCCTCCACCCGATGT~~CAC~~TTGGCCCTCTGCAAGCCAATTAG
GCCCGGTGGCAG~~TGG~~ATTAGC~~GTT~~AGTATGATCTCGCGGA (SEQ ID NO:22)

10

Intrón MVM

GGAGTCGCTGCGACGCTGCCTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCCGCCCTCGGCCGCCGCCGCCGCC
TCTGACTGACCGC~~G~~TACTCCCACAGGTGAGGCCGGACGCCCTCTCCTCCGGCTGT~~A~~TTAG
CAAGAGGTAA~~GGG~~TTAAGG~~G~~ATGGTTGGTTGGTGGG~~T~~TTAATGTTAATTACCTGTTTACAGGC
CTGAAATCACTGGTTTAGGTTGGGATCCGGTACCCAA~~T~~GGCATGGC~~T~~AGCATG~~C~~ATGAGCTCC
CTGCAGGGTTTAATGCCAACTTTG~~T~~ACAAAAAGCAGGCACC (SEQ ID NO:23)

15

AAV5GRK1miR708 155hRho (vector AAV5 con el promotor de la rodopsina quinasa que dirige la expresión de miR-708 en un andamio miR-155 y la rodopsina humana menos la secuencia diana de miR-708)

TGACTAGTTAGGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGGTCTCTCAGGGGAAAGT~~GAGG~~CGGCC~~CC~~
TGGAGGAAGGGCCGGCAGAATGATCTAATCGGATTCAAGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTCTAG
CACCTTCTGCCACTCTTAAGCCTCCGTGACCCCGGCTGGGATTAGCCTGGT~~G~~TGTGTCAGCC
CCGGTCTCCAGGGCTCCCAGTGGCCCCAGGAAC~~C~~CTCGACAGGGCCC~~G~~GTCTCTCGTCCAGC

AAGGGCAGGGACGGGCCACAGGCCAAGGGCACTAGAAGCTTATTGCGGTAGTTATCACAGTTAAAT
 TGCTAACGCAGTCAGTCTCTGACACAACAGCTCGAAGCTTAAGCTGAGTACTCTTAAGGTAG
 CCTTGCAGAAGTTGGCTGTGAGGCACTGGGCAGGTAAAGTATCAAGGTACAAGACAGGTTAAGGAGA
 CCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGACAGAGAAATGGATCCTGGAGGCTGCTGAAGGCTGTATGCTGAA
 GGAGCTTACAATCTAGCTGGGTTTGGCCACTGACTGACCCAGCTAGTGTAAAGCTCCTTCAGGACA
 CAAGGCCTGTTACTAGCACTACATGGAACAAATGGCCAGATCTGAGACTCTTGCCTTGTATGAGG
 CACCTATTGGCTTACTGACATCCACTTGCCTTCTCTCCACAGGTGTCACCTCCAGTTCACACCG
 GCACAATGAATGGCACAGAAGGCCAACTTCTACGTGCCCTCTCAATGCGACGGGTGTTGACGC
 AGGCCCTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGGCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCGCTACAT
 GTTCTGCTGATCGTCTGGGCTTCCCCTCAACTTCCACGCTACGTACCGTCCAGCACAAGA
 AGCTGCGACGCCCTCAACTACATCCTGCTCACACTAGCCGTGGCTGACCTCTTCATGGTCTAGGT
 GGCTCACCAAGCACCCTCTACACCTCTGATGGATACTTCGTCTCGGGCCACAGGATGCAATT
 GGAGGGCTTCTTGCCACCCTGGCGGTGAAATTGCCCTGTTGCTGGTCTGGTGGTCTGCCATCGAGC
 GGTACGTGGTGTGTAAGCCATGAGCAACTCCGCTGGGGAGAACCATGCCATCATGGCGTT
 GCCTCACCTGGCTATGGCGCTGCCGACCCCCACTGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCC
 CGAGGGCTGCAGTGCCTGTTGGAATCGACTACTACACGCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGTCTT
 TTGTCATCTACATGTTCTGGTCCACTTCACCATCCCCATGATTATCATCTTTCTGCTATGGCAG
 CTCGCTTCAACGCTCAAGGAGGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGTCAGGCCACACAGAAGGAGAGAA
 GGAGGTCAACCGCATGGTCATCATGGTCATCGCTTCTGATCTGCTGGTGCCTACGCCAGCG
 TGGCATTCTACATCTCACCCACCAGGGCTCAACTTCGGTCCATCTTCATGACCATCCCAGCGTTC
 TTGCCAAGAGCGCCGCATCTACAACCCCTGTCATCTATATCATGATGAAACAAGCAGTCCGGAAC
 CATGCTCACCACTCTGCTGCCAGAACCCACTGGTGACGATGAGGCTCTGCTACCGTGTCCA
 AGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGCTAACCAAGAAAGCTTAAGTTAACCGCTGATCAGCCTC
 GACTGTGCCTCTAGTTGCCAGCATCTGTTGCTGGCTCCCTGGTGCCTTGCACCGTGGAAAG
 GTGCCACTCCACTGTCTTCTAATAAAATGAGGAATTGATCGCATGCCATTGCTGAGTAGGTGTCA
 TCTATTCTGGGGGTGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGC
 TGGGATGCGGTGGCTATGGC (SEQ ID NO:24)

AAV5GRK1miR708 708hRho (vector AAV5 con el promotor de la rodopsina quinasa que dirige la expresión de miR-708 en un andamio miR-708 y la rodopsina humana menos la secuencia diana de miR-708)

GGGCCCCAGAACGCTGGTGGTTGTCCTTCTCAGGGAAAAGTGAGGCGGCCCTGGAGGAAGG
 GGCCTGGCAGAATGATCTAACGATTCCAAGCAGCTCAGGGGATTGTCCTTTCTAGCACCTTCTG
 CCACTCTAACGCTCCTCGTGAACCCGGCTGGGATTAGCCTGGTGTGTCAGCCCCGGTCTCCC
 AGGGCTTCCCAGTGGTCCCAGGAACCCCTGACAGGGCCGGTCTCTCGTCCAGCAAGGGCAGGG
 ACAGGCCACAGGCCAAGGGCACTAGAAGCTTATTGCGGTAGTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCA
 GTCAGTGCCTCTGACACAACAGCTCGAACTTAAGCTGCACTCTTAAGGTAGCCTTGAGAA
 GTTGGTGTGAGGCACTGGCAGGTAAAGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTAAGGAGACCAATAGAAA
 CTGGGCTTGTGAGACAGAGAAAAACCTAACCCCCATGGTTGGCGAGGGACTGCTGTGTGAAATGG
 TAACTGCCCTCAAGGAGCTTACAATCTAGCTGGGGTAAATGACTTGACATGAACACAACACTAGACTG
 TGAGCTCTAGAGGGCAGGGACCTTACCCCTAGTCATCTCTCACCCCTGACACCCCTCCCTGAGG
 GATCTCATGACTCTGCTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTGCCTTCTCT
 CCACAGGTGCCACTCCAGTTCACACCGGCACAATGAATGGCACAGAAGGCCAACTTCTACGTGC
 CCTCTCCAATGCGACGGGTGTTGACCGCAGGCCCTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCA
 TGGCAGTTCTCCATGCTGGCGCCTACATGTTCTGCTGATGTCCTGGCTTCCCCTCAACTTCT
 CACGCTCACGTACCGTCCAGCACAAGAAGCTGCCACGCCCTCAACTACATCCTGCTCACCTAG
 CCGTGGCTGACCTTCTCATGGCTTAGGTGGCTTACCGACACCCCTACACCTCTGCTGATGGATAC
 TTCGTTCTGGGCCACAGGATGCAATTGGAGGGCTTCTTGCCACCCCTGGCGGTGAAATTGCCCT
 GTGGTCTTGGTGGCTGGCCATGAGCGGTACGTTGGGTGTGTAAGCCATGAGCAACTCCGCT
 TCGGGGAGAACCATGCCATCATGGCGTTGCCTTACCTGGTCTGGCGCTGGCCTGCGCCGCACCC
 CCACTCGCCGGCTGGTCCAGGTACATCCCCGAGGGCCTGCAAGTGTGTTGGAATCGACTACTACAC
 GCTCAAGCCGGAGGTCAACAACGAGCTTGTCACTACATGTTGTCAGTGGTCCACTCACCATCCCCA
 TGATTATCATCTTTCTGCTATGGCAGCTCGTCTCACCGTCAAGGAGGCCGCTGCCAGCAGCAG
 GAGTCAGCCACCACACAGAAGGAGGTACCCGCATGGTCACTCATGGTATCGCTT
 CCTGATCTGCTGGGTGCCCTACGCCAGCGTGGCATTCTACATCTCACCCACCAGGGCTCCAACCTCG

GTCCCCATCTTCA TGACC ATCCCAGCGTCTT GCCAAGAGCGCCGCATCTACAACCC TGT CATCTAT
 ATCATGATGAACAAGCAGTTCCGAACTGCATGTCACCACCATCTGCTGCGCAAGAACCACTGGG
 TGACGATGAGGCCTCTGCTACCGTGCTCCAAGACGGAGACGGAGCCAGGTGGCCCCGCTAACCAAGAA
 AGCTTAAGTTAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCC
 CTCCCCCGTGCCTCCTGACCC TGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTCTTAATAAAATGAGGAAA
 TTGCATCGCATTGTCAGTGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGGATGCGGTGGCTATGGC (SEQ ID NO:25)

AAV5OPSMiR708 155hRho (vector AAV5 con promotor de opsina que dirige la expresión de miR-708 en un andamio miR-155 y rodopsina humana menos la secuencia diana de miR-708)

ACCGGTTTCTGCAGCGGGATTAAATATGATTATGAACACCCCCAATCTCCAGATGCTGATTCAGCC
 AGGAACATAGTTATTAAATAGTAATCAATTACGGGGCATTAGTTCATAGCCCATAATGGAGTCCGCG
 TTACATAACTTACGGTAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAAACGACCCC GCCATTGACGTCAATA
 ATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACG
 GTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATG
 ACGGTAATGGCCCGCTGGCATTAGGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTCCATTGACGTAC
 ATCTACGTATTAGTCATCGTATTACCAAAATAGTTATCGAGCGCTGAGCCGGGGGGGGGGGG
 TGAGACTGGAGGCATGGACGGAGCTGACGGCACACAGCTCAGATCTGTCAAGTGAGCCATTGTCA
 GGGCTTGGGACTGGATAAGTCAGGGGCTCTGGGAAGAGATGGGATAGGTGAGTTCAAGGAGGAGA
 CATTGTCAACTGGAGCCATGTGGAGAAGTGAATT TAGGGGAAAGGTTCCAGTCAGCCTGAGGCC
 ACCAGACTGACATGGGGAGGAATTCCACAGGACTCTGGGGCAGACAAGATGAGACACCCCTTCC
 CTTACCTAACGGGCTCCACCGATGTCACCTGGCCCTCTGCAAGCCAATTAGGCCGGTGGCAG
 CAGTGGGATTAGGGTTAGTATGATACTCGCGATGCTGAATCAGCCCTGGCTTAGGGAGAGAAGGT
 CACTTATAAGGGTCTGGGGGGGCTCAGTGCTGGAGTTGCGCTGTGGAGCCGCTAGTGGCTGAGCT
 CAACTAGAAGCTTATTGCGGTAGTTATCACAGTTAAATTGCTAACGCAGTCAGTGCTCTGACACA
 ACAGTCTCGAACCTAACGGTGCAGTGCAGTCTAACGGTACGTTGAGCTGAGGCACTG
 GGCAGGTAAGTACAGGTTAACAGACAGGTTAACGGAGACCAATAGAAACTGGCTTGTGAGACAG
 AGAATGGATCCTGGAGGCTGCTGAAGGCTGTATGCTGAAGGGCTTACAATCTAGCTGGGTTTTGG
 CCACTGACTGACCCAGCTAGTGTAAAGCTCCTCAGGACACAAGGCTGTTACTGCACTCACATGGA
 ACAAAATGGCCAGATCTGAGACTCTGCTGTTCTGATAGGCACCTATTGGCTTACTGACATCCACTT
 TGCTTTCTCTAACAGGTGTCACCTCCAGTCACACGGGACAATGAATGGCACAGAACGGCCCTAA
 CTTCTACGTGCCCTCTCCAAATGCGACGGGTGGTACGCGAGCCCTTCAGTGGCTTACCCACAGTACTACC
 TGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCCATGCTGGCCGCTACATGTTCTGCTGATCGTGTGGCTTCCCC
 ATCAACTTCCCTACGCTCTACGTACCGTCCAGCACAAGAAGCTGCGCACGCCCTCAACTACATCCT
 GCTCAACCTAGCCGGTGGCTGACCTCTCATGGTCTTAGGGCTTCACCCAGCACCTCTACACCTCTC
 TGCATGGATACTCGTCTCGGGCCCACAGGATGCAATTGGAGGGCTTCTTGCCACCCCTGGCGGT
 GAAATTGCCCTGTGGCTCTGGTGGCTGGCATCGAGCGGTACGGTGGTGTGTAAGGCCATGAG
 CAACTCCCGTGGGAGAACCATGCCATCATGGCGTGGCTTACCTGGGTATGGCGTGGCCT
 GCGCCGACCCCCACTCGCCGGCTGGTCAGGTACATCCCCGAGGGCTGAGTGTGGTGGAAATC
 GACTACTACAGCTAACGCCGGAGGTCAACACGAGTCTTGTATCTACATGTTCTGTTCCACTT
 CACCATCCCCATGATTATCATCTTCTGCTATGGCAGCTCGTCTCACCGTCAAGGGAGGCCGCTG
 CCCAGCAGCAGGAGTCAGCCACACAGAAGGCAGAGAAGGGAGGTACCCGCATGGTATCATCAT
 GTCATCGCTTCTCTGCTGGTGGCTACGCCAGCGTGGCATTCTACATCTTACCCACCAAGGG
 CTCCAACCTCGGCTCCATCTTCA TGACC ATCCCAGCGTTCTTGCCAAGAGCGCCCATCTACAACC
 CTGTCATCTATATCATGATGAACAAGCAGTTCCGGAACTGCATGCTACCCATCTGCTGCGGCAAG
 AACCCACTGGGTGACGATGAGGCCTCTGCTACCGTGTCCAAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCCGGC
 CTAACCAAGAAAGCTTAAGTTAACCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTCTAGTTGCCAGCCATCT
 GTTGTGTTGCCCTCCCCGTGCCTCTTGACCC TGGAAGGTGCCACTCCACTGTCCTTCTTAATA
 AAATGAGGAAATTGCA TCGCATGTCAGTGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGGGTGGGGCAGG
 ACAGCAAGGGGGAGGATGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGCTATGGC
 (SEQ ID NO:26)

AAV5OPSMiR708 708hRho (vector AAV5 con el promotor de opsina que dirige la expresión de miR-708 en un andamio miR-708 y rodopsina humana menos la secuencia diana de miR-708)

ACCGCGTTCTGCAGCGGGGATTAATATGATTATGAACACCCCCAATCTCCCAGATGCTGATTCAAGCC
 AGGAACATGTTATTAAATAGTAATCAATTACGGGTCAATTAGTCATAGCCCATATATGGAGTCCCGCG
 TTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATA
 ATGACGTATGTTCCCATTAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACG
 GTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATG
 ACGGTAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAAGTACATGACCTTATGGACTTCCACTTGGCAGTAC
 ATCTACGTATTAGTCATCGTATTACACAAATAGTTATCGAGCGCTGAGCCGGGGCGGGGGGTG
 TGAGACTGGAGGCATGGACGGAGCTGACGGCACACACAGCTCAGATCTGTCAAGTGAGCCATTGTCA
 GGGCTTGGGACTGGATAAGTCAGGGGCTCTGGAAAGAGATGGGATAGGTGAGTCAGGAGGAGA
 CATTGTCAACTGGAGCATGTGGAGAAGTGAATTAGGGCCAAAGGGTCCAGTCGCAGCCTGAGGCC
 ACCAGACTGACATGGGAGGAATTCCCAGAGGAACCTGGGGCAGACAAGATGAGACACCCCTTCCTT
 CTTTACCTAAGGGCTCCACCGATGTCACCTTGGCCCTCTGCAAGCCAATTAGGCCCGTGGCAG
 CAGTGGGATTAGCGTTAGTATGATATCTCGCGATGCTGAATCAGCCTCTGGCTAGGGAGAGAAGGT
 CACTTATAAGGGTCTGGGGGGTCAGTGCCTGGAGTTGCGCTGTGGAGGCCGTAGTGGCTGAGCT
 CAACTAGAAGCTTATTGGCTAGTTTACAGTAAATTGCTAACCGCAGTCAGTGCTTCTGACACA
 ACAGTCTGAACTTAAGCTGCACTGACTCTTAAGGTAGCCTTGAGAAGTTGGCTGTGAGGCAG
 GGCAGGTAAGTATCAAGTTACAAGACAGGTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCTTGTGAGACAG
 AGAAAAAACCTAACCCCCATGGTGGCAGGGACTGCTGTGTGAAATGGTAACTGCCCTAAGGAGC
 TTACAATCTAGCTGGGGTAAATGACTTGCACATGAACACAACAGACTGTGAGCTTCTAGAGGGCAG
 GGACCTTACCTAGTCATCTCTTCTCACCCCTGACACCCCTCCCTGAGGGATCTCATGACTCTTGCG
 TTCTGATAGGCACCTATTGGCTTACTGACATCCACTTGCCTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCC
 AGTTCACACCGCACAATGAATGGCACAGAAGGCCAACTTCTACGTGCCCTCTCAATGCGACGG
 GTGTGGTACCGCAGCCCTTCGAGTACCCACAGTACTACCTGGCTGAGCCATGGCAGTTCTCATGCTG
 GCCGCTACATGTTCTGCTGATCGTGTGGCTTCCCATCAACTTCTCACGCTTACGTACCGT
 CCAGCACAAGAAGCTGCGCACGCTCAACTACATCTGCTCAACCTAGCGTGGCTGACCTTCA
 TGGTCTAGGTGGCTTACAGCACCCCTACACCTCTGCTGATGGATACTTCGTCTGGGCCACA
 GGATGCAATTGGAGGGCTTITGCCACCCCTGGCGTAAATTGCCCTGGCTTGGGCTTGGTGCCT
 GGCATCGAGCGGTACGGTGTGTAAGCCATGAGCAACTTCCGTTCGGGAGAACATGCCA
 TCATGGCGTTGCCTCACCTGGGTCAATGGCGTGGCTGCGCCGACCCCCACTCGCCGGCTGGTCC
 AGGTACATCCCCGAGGGCTGCACTGCTGTGGAATCGACTACTACACGCTCAAGCCGGAGGTCAA
 CAAAGAGTCTTGTACATGATGTTCTGTTGCTGCACTTCACCATCCCCATGATTATCATCTTCT
 GCTATGGCGAGCTGCTTCAACGCTCAAGGAGGCCGCTGCCAGCAGCAGGAGTCAGCCACACAG
 AAGGCAGAGAAGGAGGTACCCGATGGTCATCATGGTCATGCTGCTTCTGATCTGCTGGTGCC
 CTACGCCAGCGTGGCATCTACATCTCACCCACCAGGGCTCAACTCAGGCTCCATCTCATGACCA
 TCCCAGCGTCTTGCACAGAGCGCCCATCTACACCCGCTCATCTATATCATGATGAACAGCAG
 TTCCGGAACTGCATGCTCACCACTGCTGCCAGAAGACCCACTGGGTGACGATGAGGCTCTGC
 TACCGTGTCCAAGACGGAGACGAGCCAGGTGGCCCGGCTAACCAAGAAAGCTTAAGTTAACCGC
 TGATCAGCCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGCCCTCCCCGTGCCTTCT
 GACCCCTGGAGGTGCCACTCCACTGCTCTTCTAATAAAATGAGGAATTGCAATGCCATTGTCTGA
 GTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGTGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAAT
 AGCAGGCATGCTGGGATGCCGTGGCTATGGC (SEQ ID NO:27)

Factor de transcripción que contiene Homeobox de conos y bastones

AGAGGACTAACGCCACAGGTGAGGGAGAAAGGGGGGGGGGTCTGCTGACCCAGCAACACTCTTCCCT
 CTGAGGCTTAAGAGCTATTAGCGTAGGTGACTCAGTCCCTAATCCTCATTCAATGCCCTGTGACTGC
 CCTGCTTC (SEQ ID NO:28)

5

Potenciador de CMV

ACTAGTTATAATAGTAATCAATTACGGGTCAATTAGTCATAGCCCATATATGGAGTCCCGCTTAC
 ATAACCTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGA
 CGTATGTTCCCATTAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTAA
 ACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGG
 TAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAAGTACATGACCTTATGGACTTCCACTTGGCAGTACATCT
 ACAGTATTAGTCATCGTATTACCA (SEQ ID NO:29)

Factor de cremallera de leucina básica de la retina neural

TTTCTGCAGCGGGATTAATATGATTATGAACACCCCCAATCTCCAGATGCTGATTGCCAGGA
 (SEQ ID NO:30)

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una primera partícula de rAAV que comprende un primer ácido nucleico que codifica miR-708 y una segunda partícula de rAVV que comprende un segundo ácido nucleico que codifica rodopsina.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el primer ácido nucleico que codifica el miR-708 comprende el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o en la que el primer ácido nucleico que codifica el miR-708 comprende un ácido nucleico que tiene al menos el 85% de identidad con la SEQ ID NO: 1.
- 10 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que el primer ácido nucleico que codifica miR-708 comprende un andamio miR-708 endógeno o un andamio miR-155.
- 15 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el primer ácido nucleico que codifica miR-708 y/o el segundo ácido nucleico que codifica rodopsina está operativamente unido a un promotor, opcionalmente en la que el promotor expresa el miR-708 y/o la rodopsina en células fotorreceptoras, y opcionalmente en la que el promotor comprende un promotor de rodopsina quinasa (RK), un promotor de opsina o un promotor de β-actina de pollo (CBA).
- 20 5. La composición de la reivindicación 4, en la que la secuencia derivada de un intrón de virus diminuto de ratón (MMV) se encuentra 3' con respecto al promotor, en la que opcionalmente el intrón MMV comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 23.
- 25 6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el segundo ácido nucleico que codifica la rodopsina comprende una sustitución, una inserción o una delección de ácido nucleico en la secuencia diana de miR-708 o carece de la secuencia diana de miR-708 UTR 3' en la que la sustitución, la inserción o la delección reduce o impide el reconocimiento por el miR-708.
- 30 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que la rodopsina comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o en la que el segundo ácido nucleico que codifica la rodopsina comprende un ácido nucleico que tiene el 85% de identidad con la SEQ ID NO: 3.
- 35 8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la primera partícula de rAAV y/o la segunda partícula de rAAV comprende una cápside de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV2/2-7m8, AAV DJ, AAV2 N587A, AAV2 E548A, AAV2 N708A, AAV V708K, un AAV de cabra, AAV1/AAV2 químérico, AAV bovino o rAAV/HBoVI de cápside AAV de ratón; y/o en la que la primera partícula de rAAV y/o la segunda partícula de rAAV comprende repeticiones terminales invertidas (ITR) de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, un AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón.
- 40 9. La composición de la reivindicación 8, en la que la primera partícula de rAAV y/o la segunda partícula de rAAV comprende una cápside AAV-5 o una cápside mutante de tirosina AAV-5, y en la que la primera partícula de rAAV y/o la segunda partícula de rAAV comprende ITR de AAV2.
- 45 10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la composición es una composición farmacéutica, en la que opcionalmente la composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 11. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en un procedimiento de tratamiento de retinitis pigmentaria en un mamífero, en la que opcionalmente la retinitis pigmentaria es retinitis pigmentaria autosómica dominante o retinitis pigmentaria autosómica recesiva.
12. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en un procedimiento de tratamiento de estrés del retículo endoplasmático (RE) en una célula de un mamífero.
- 55 13. La composición para el uso de la reivindicación 11 o 12, en la que la composición se inyecta en el espacio subretiniano de la retina del mamífero en una o más de una ubicación, o en la que la composición se inyecta por vía intravítreas al mamífero.
14. Un kit que comprende:
- 60 a) una cantidad eficaz de una partícula de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica miR-708, o
- b) una cantidad eficaz de una partícula de rAAV que comprende un primer ácido nucleico que codifica miR-708 y un segundo ácido nucleico que codifica rodopsina, o

- c) una cantidad eficaz de una primera partícula de rAAV que comprende un primer ácido nucleico que codifica miR-708 y una cantidad eficaz de una segunda partícula de rAAV que comprende un segundo ácido nucleico que codifica rodopsina.
- 5 15. Un constructo de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID NO: 5, 6, 7, 24, 25, 26 o 27.

FIG. 1A

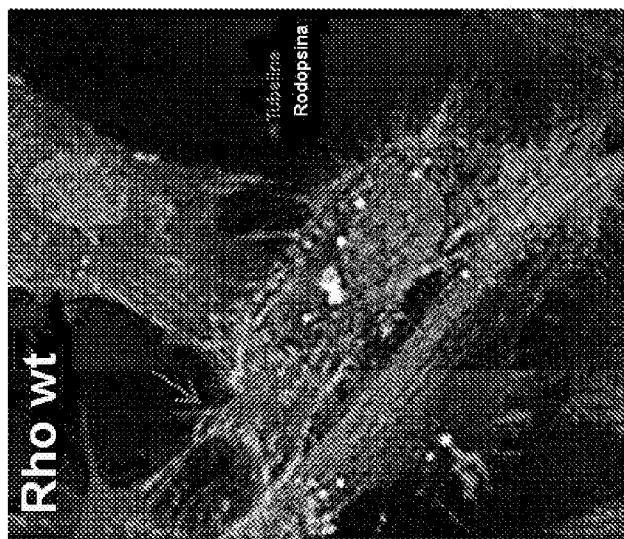


FIG. 1B

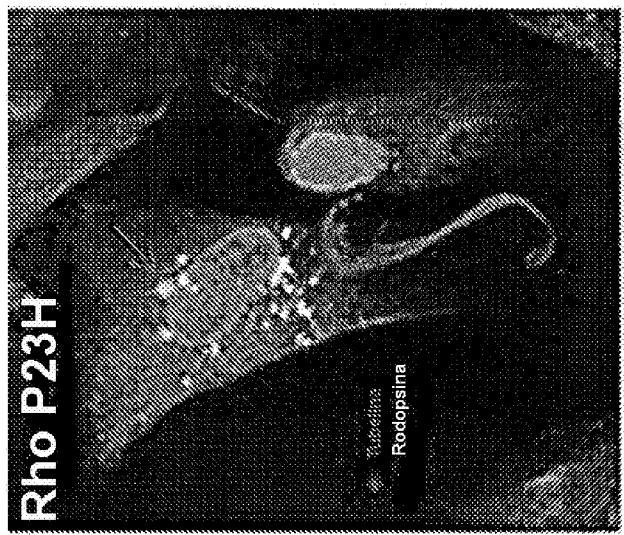


FIG. 1A Y 1B

FIG. 2A

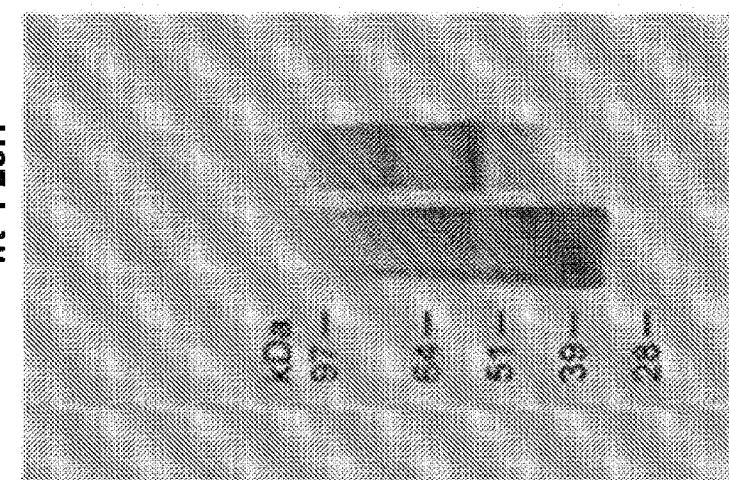


FIG. 2B

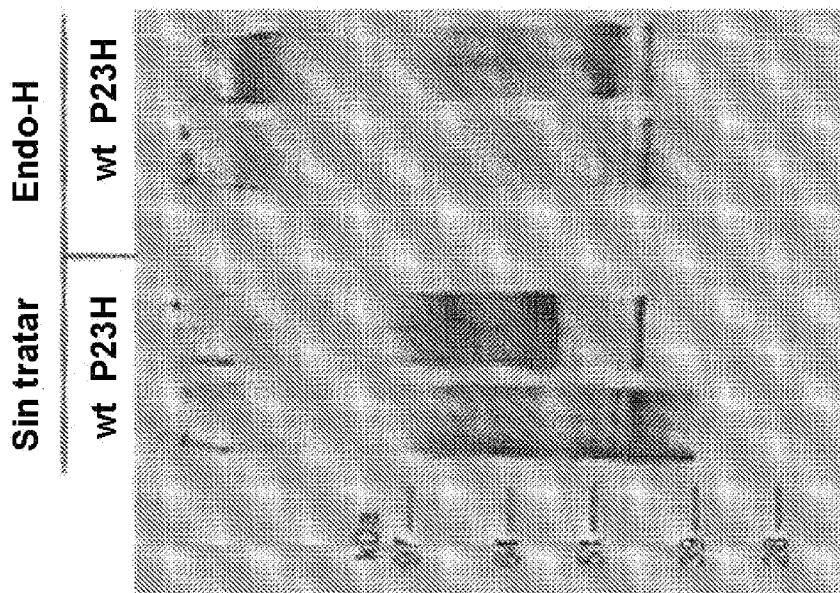


FIG. 2A Y 2B

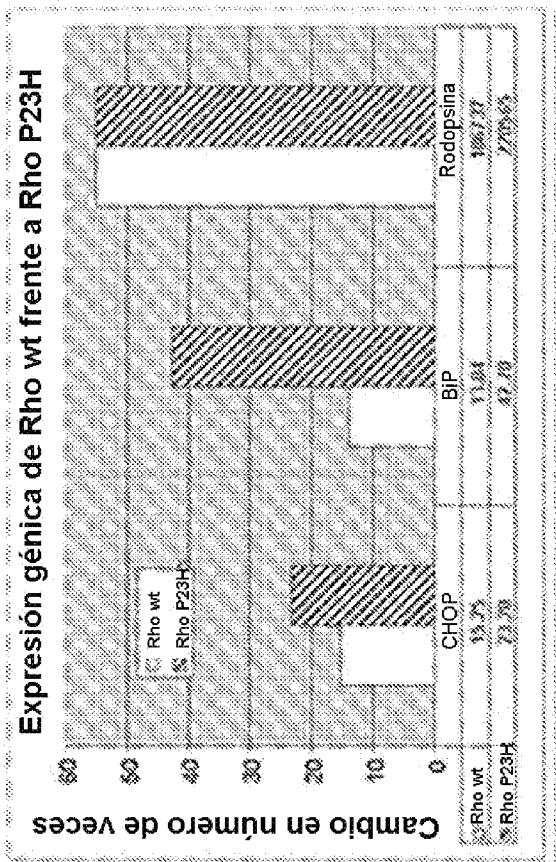
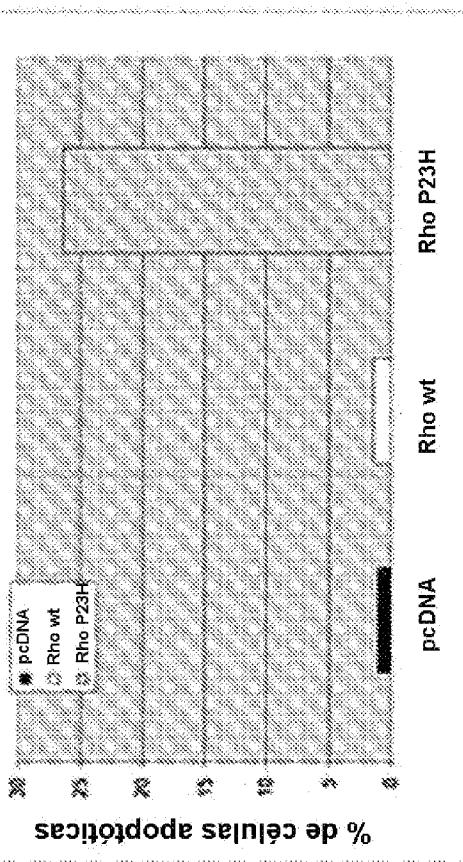


FIG.3B
TUNEL / transfección de RPE



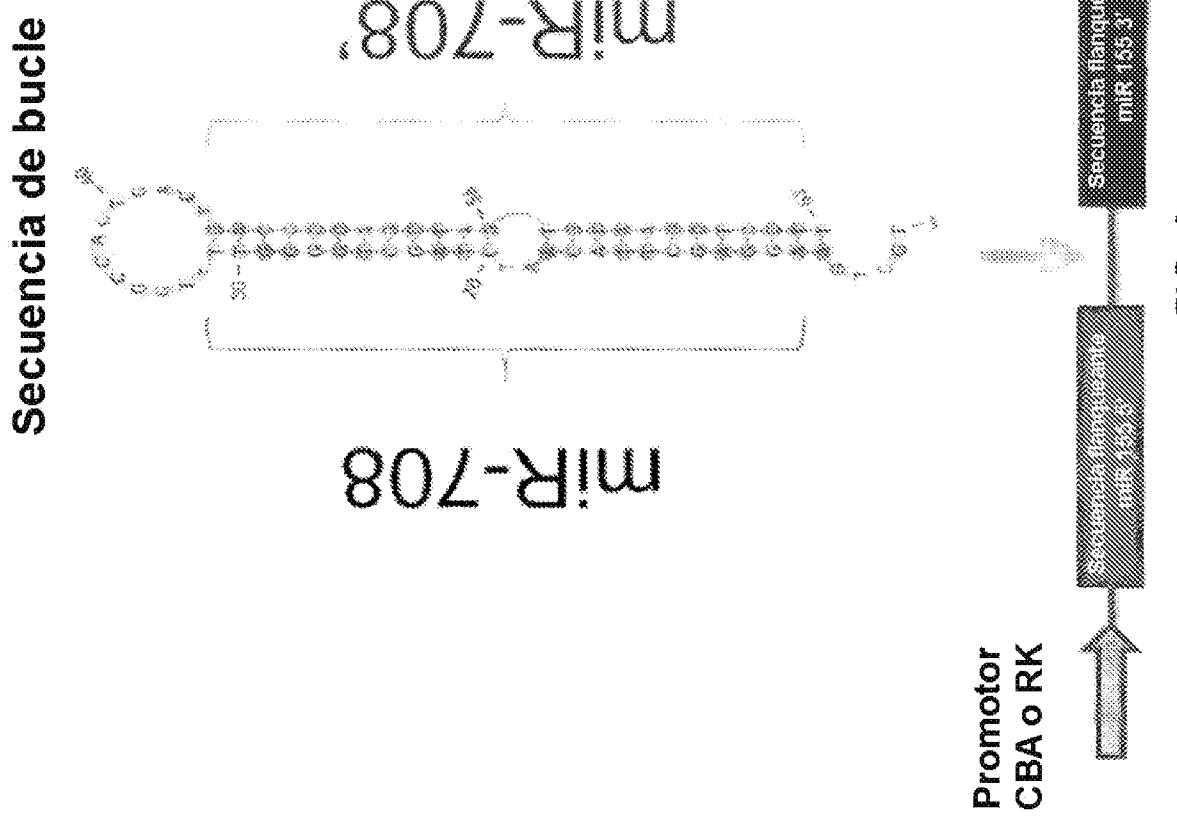


FIG. 4

Atenuación de rodopsina por miR-708 en células HEK-293

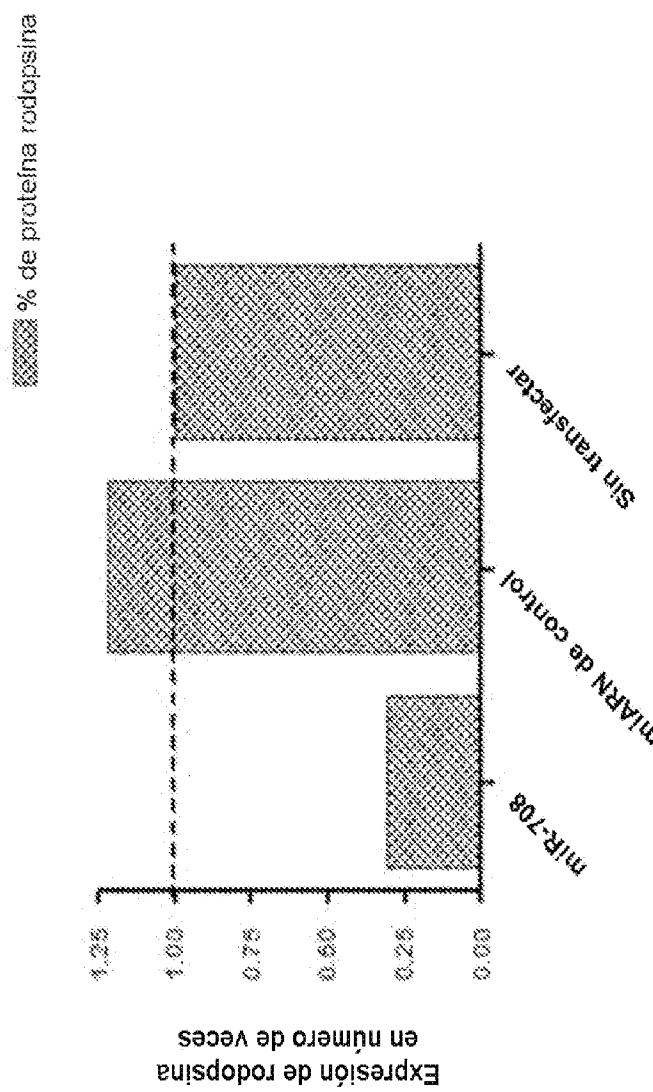


FIG. 5

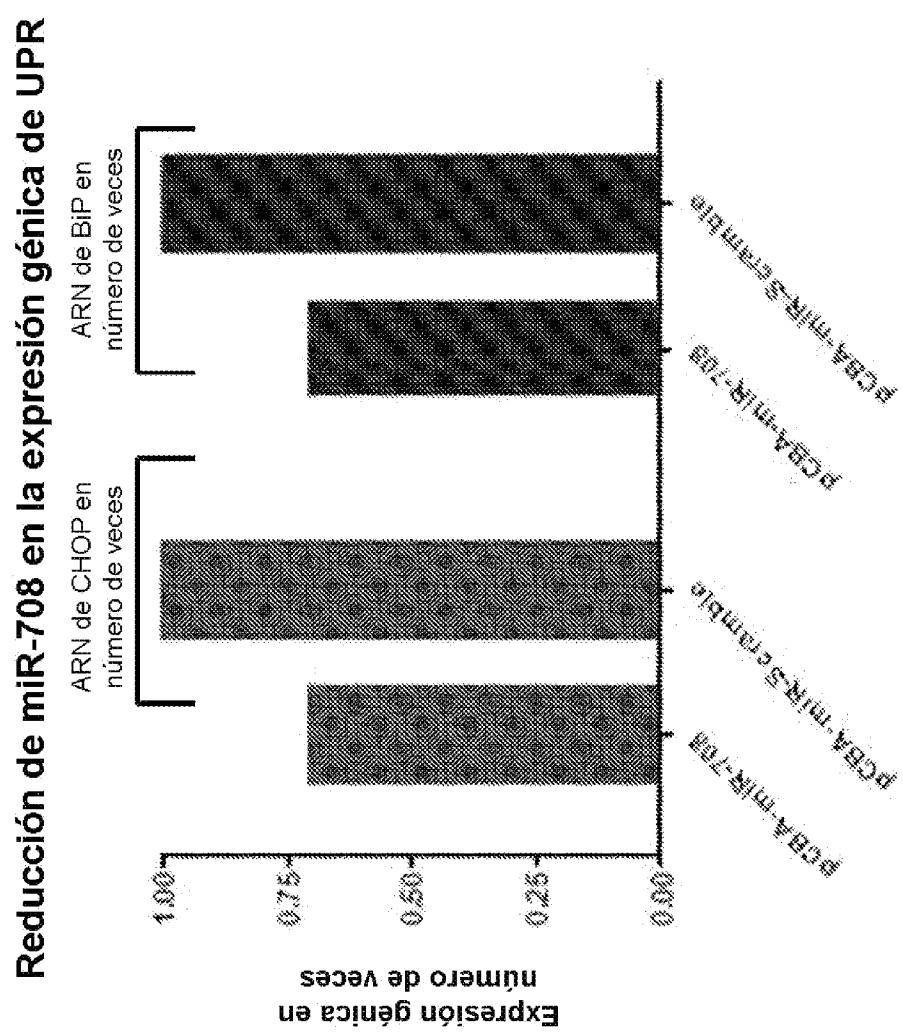


FIG. 6

FIG. 7A

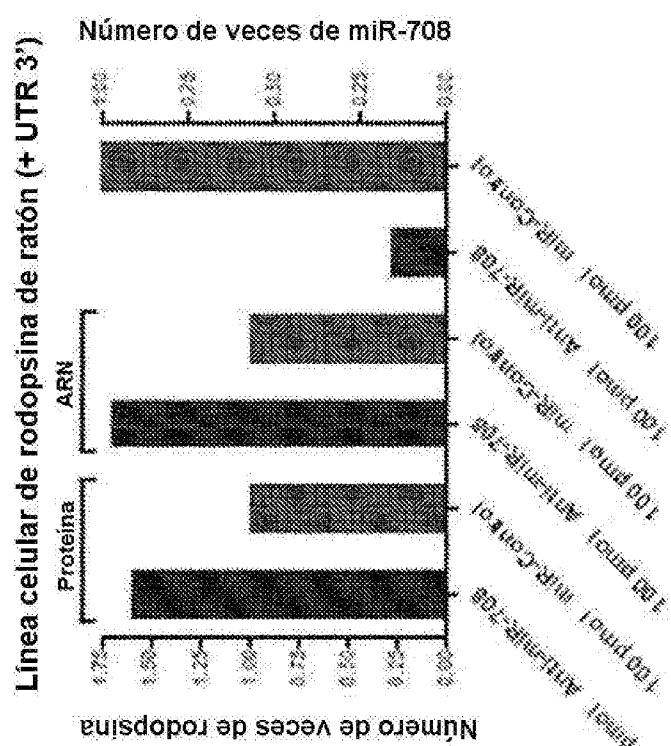


FIG. 7B

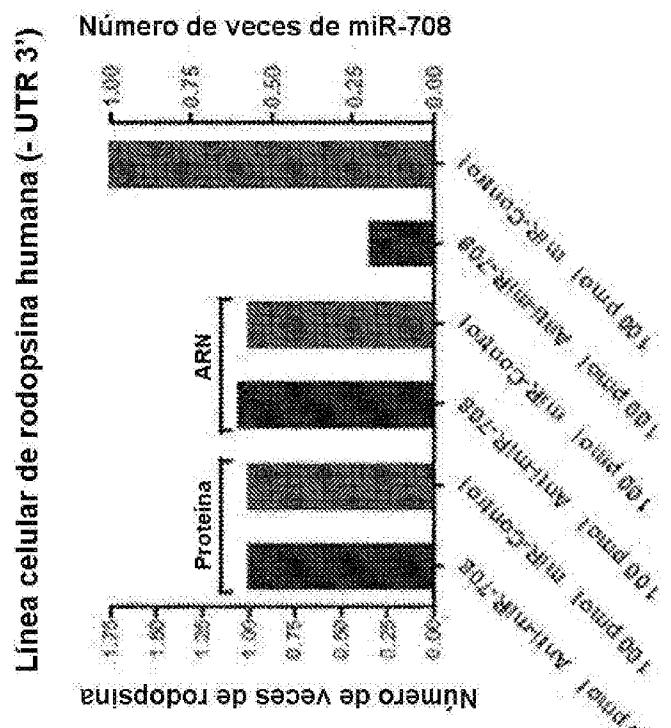


FIG. 7AY7B

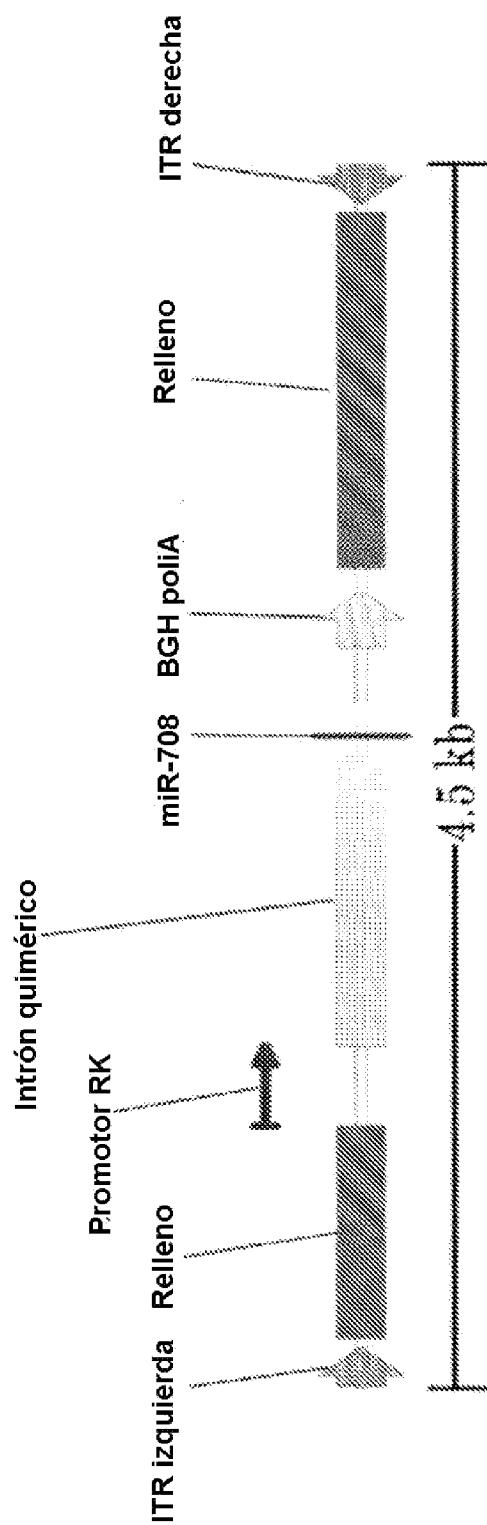


FIG. 8

FIG. 9A

Expresión de miR-708

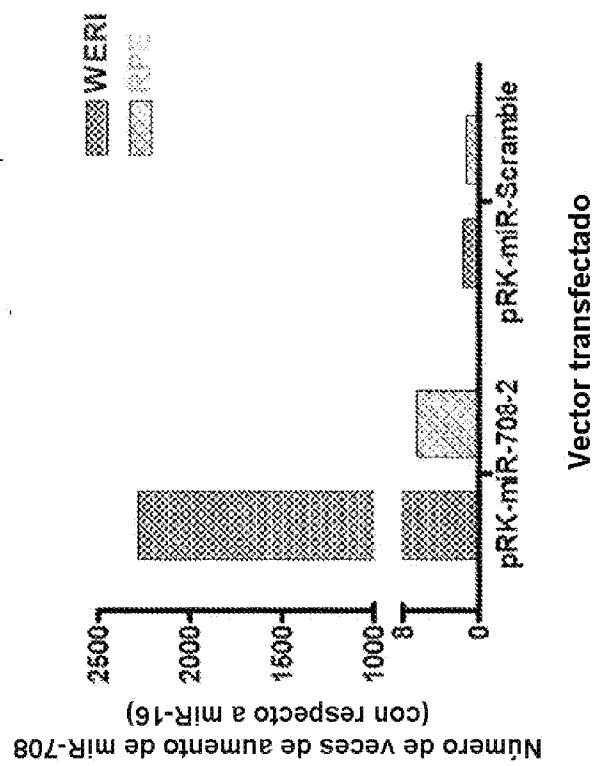


FIG. 9B

Transfección de células WERI

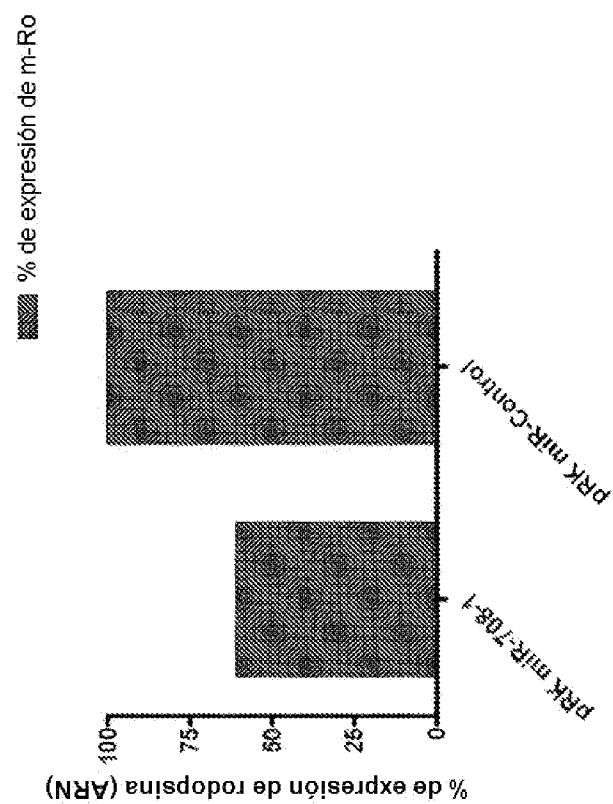


FIG. 9A Y 9B

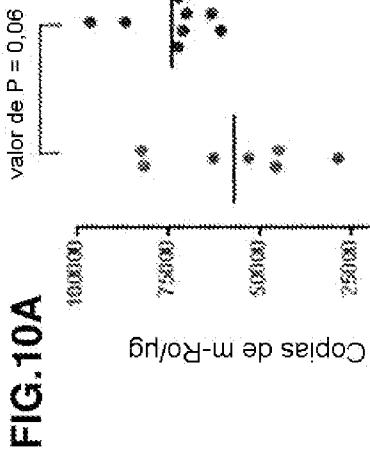


FIG. 10B

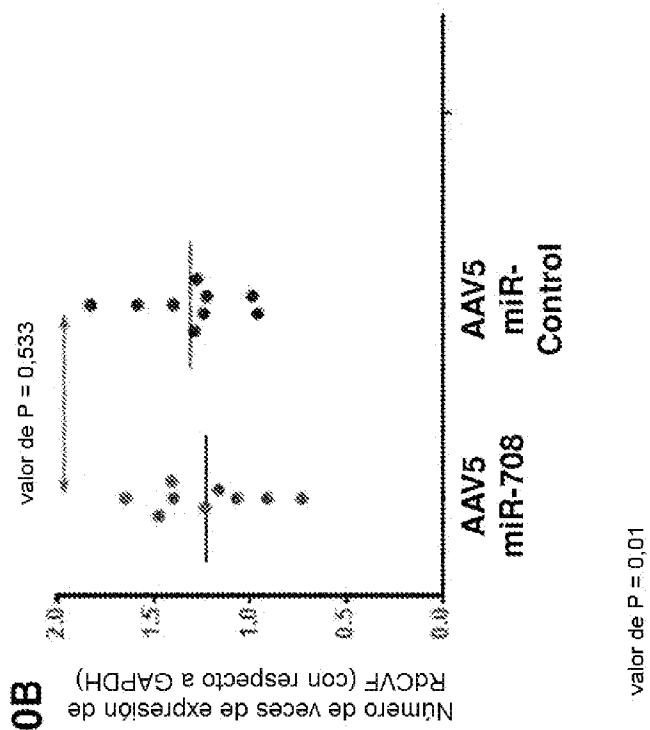


FIG. 10C

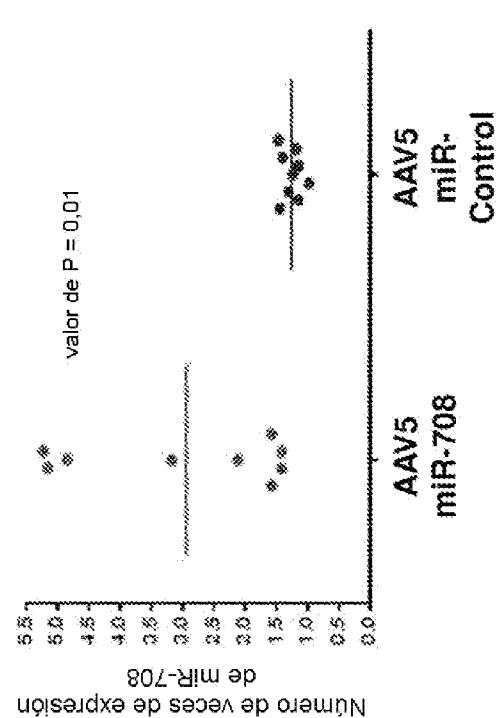
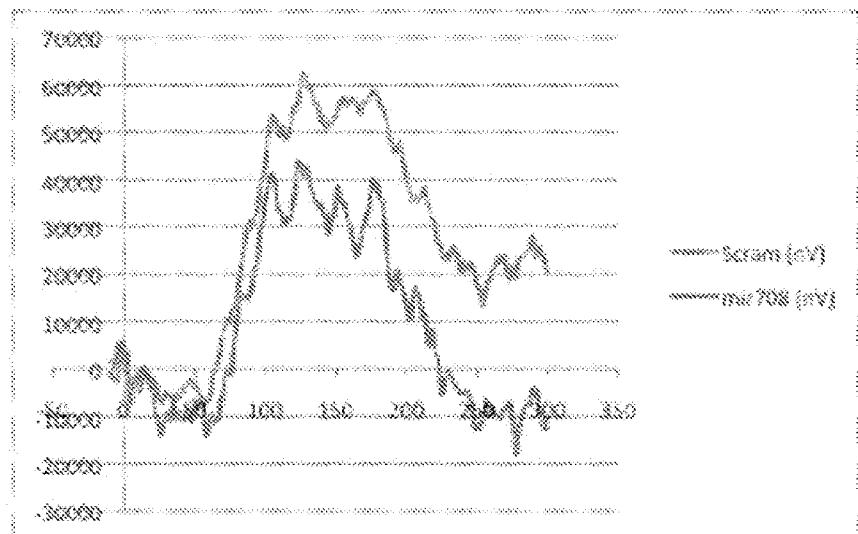


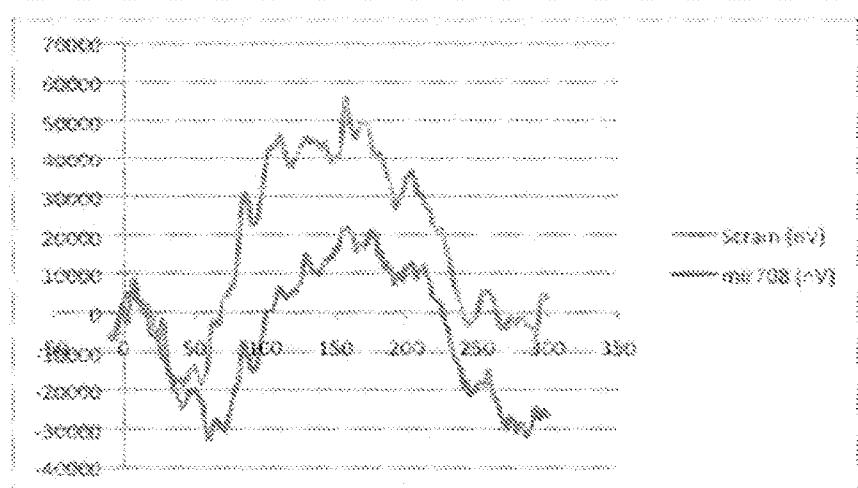
FIG. 10A-10C

FIG. 11A

**Animal N°
45595**



**Animal N°
45596**



**Animal N°
45599**

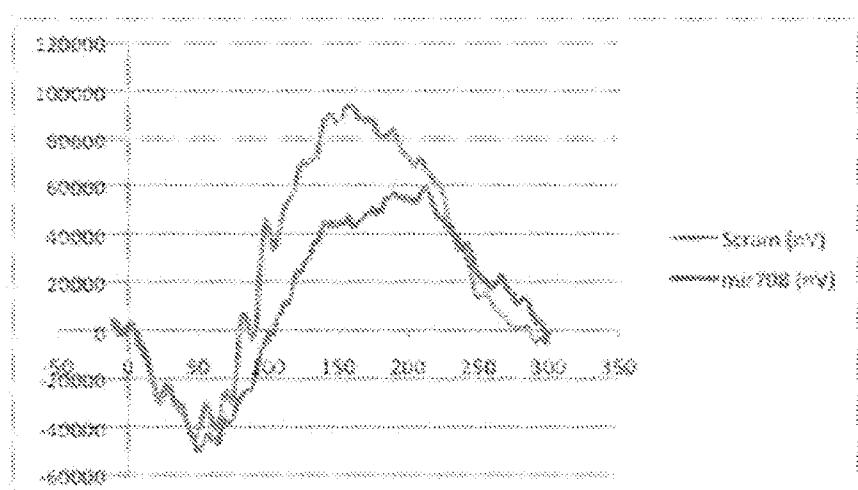
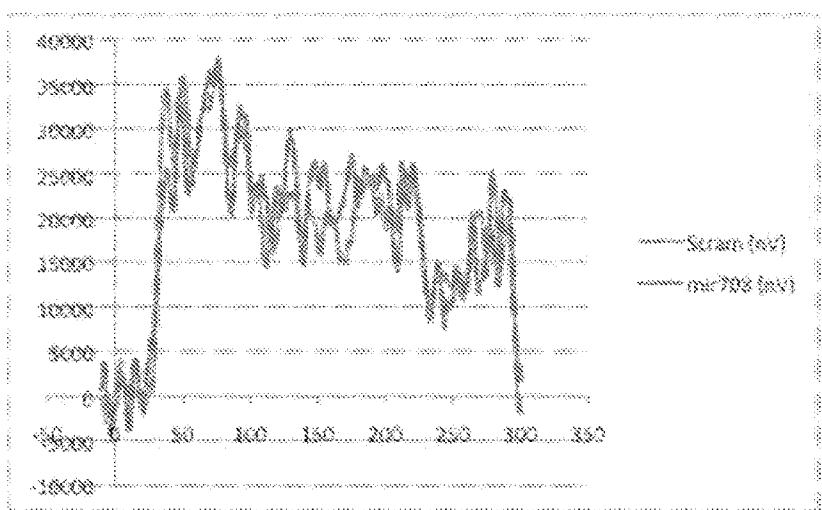
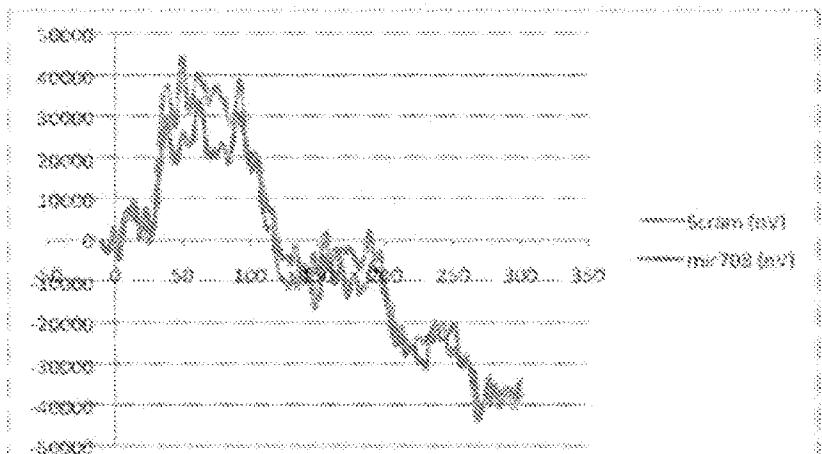


FIG. 11B

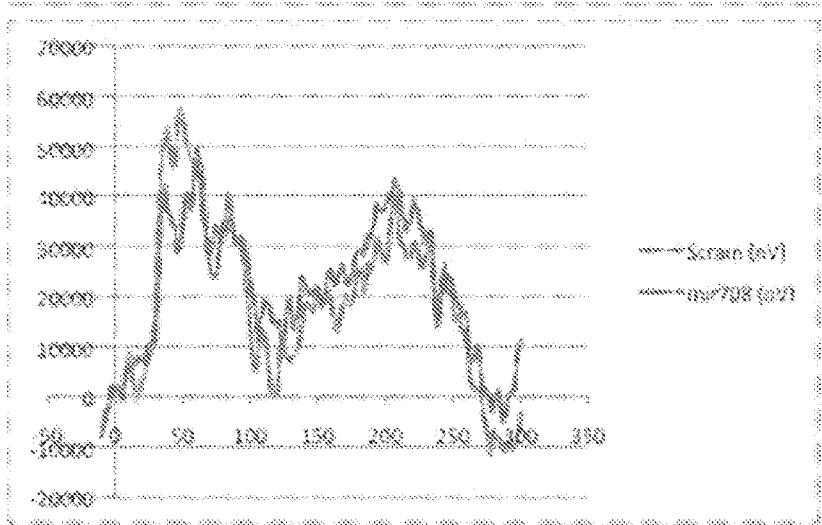
Animal N°
45595



Animal N°
45596



Animal N°
45599



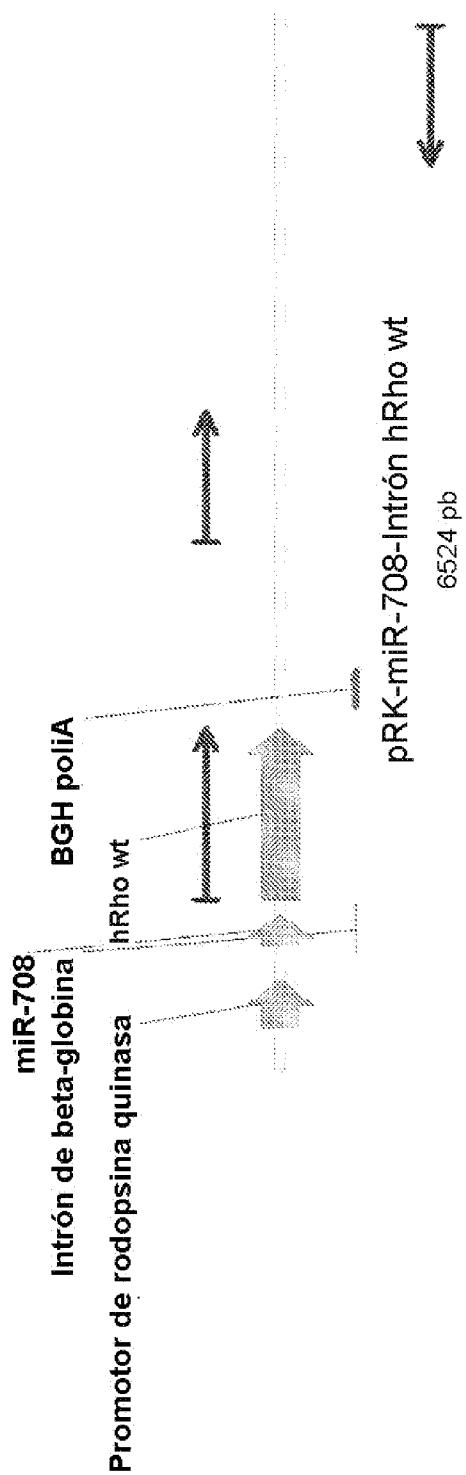
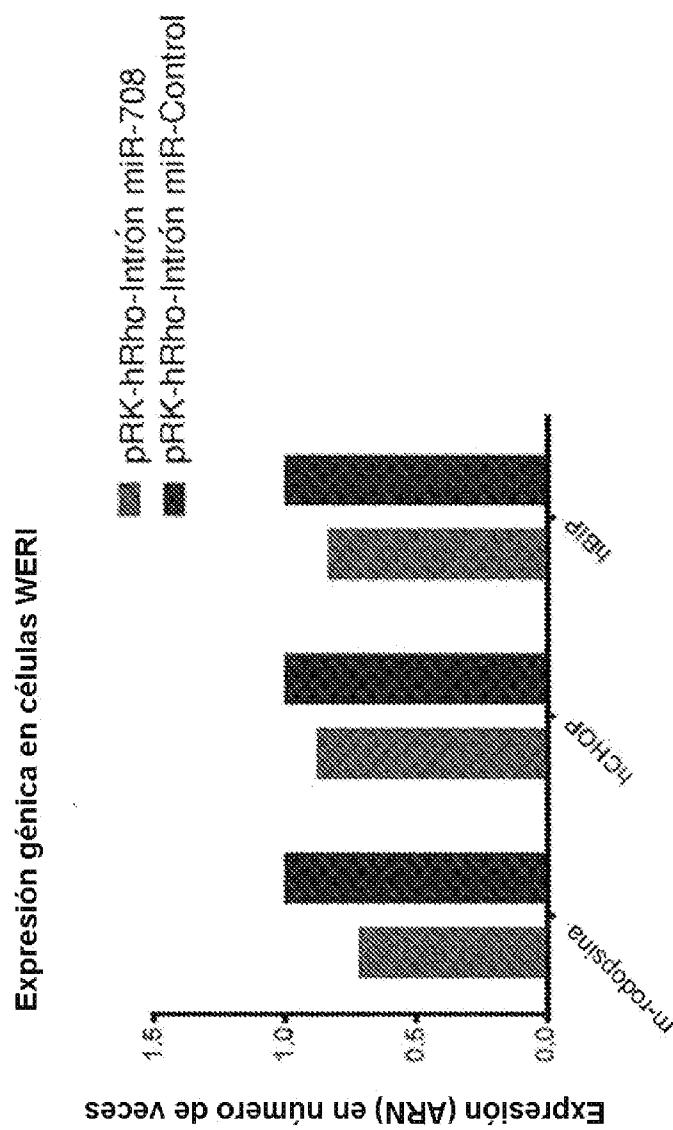
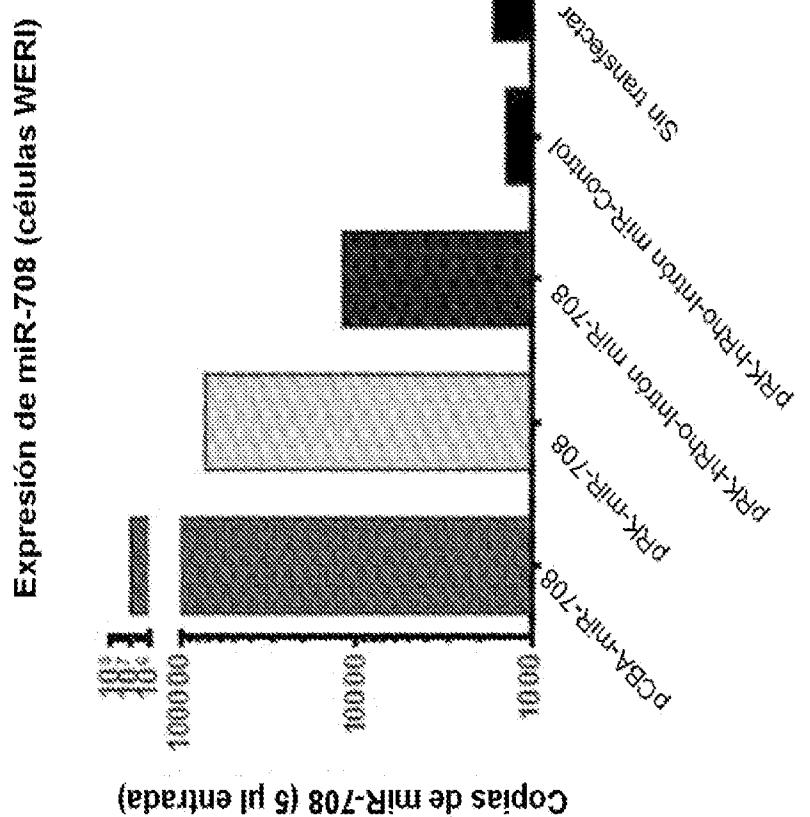
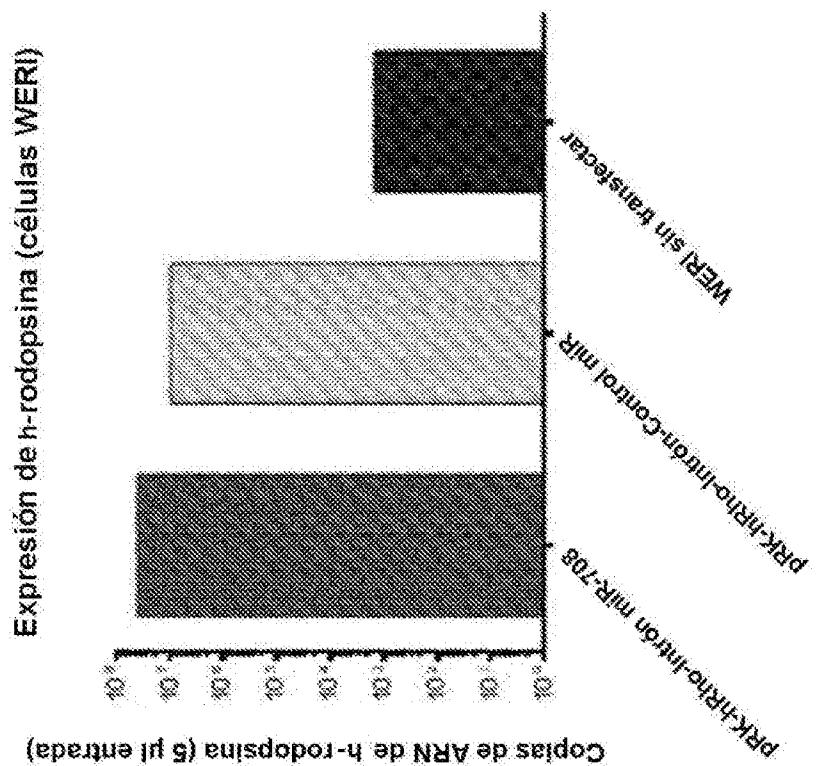


FIG. 12







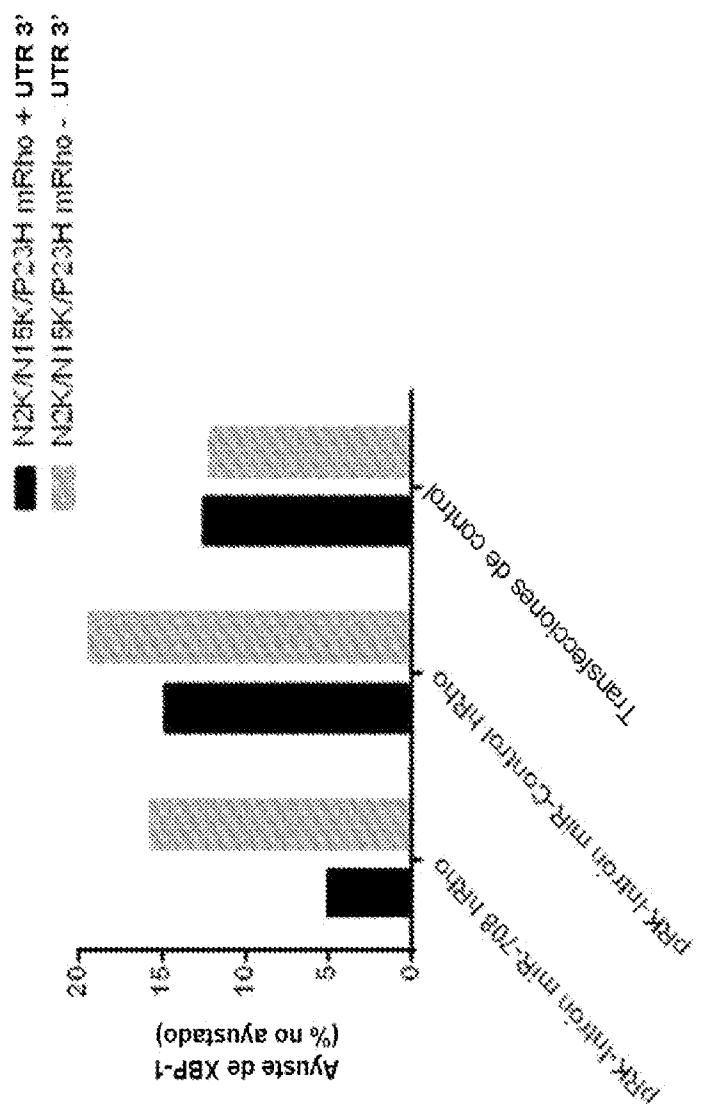


FIG. 16

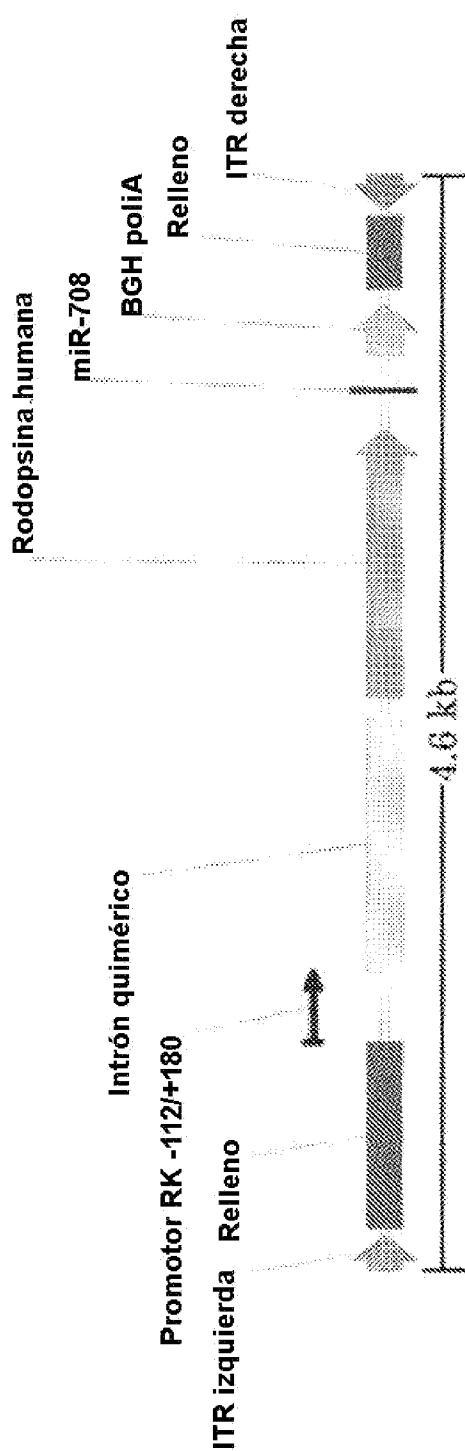


FIG. 17

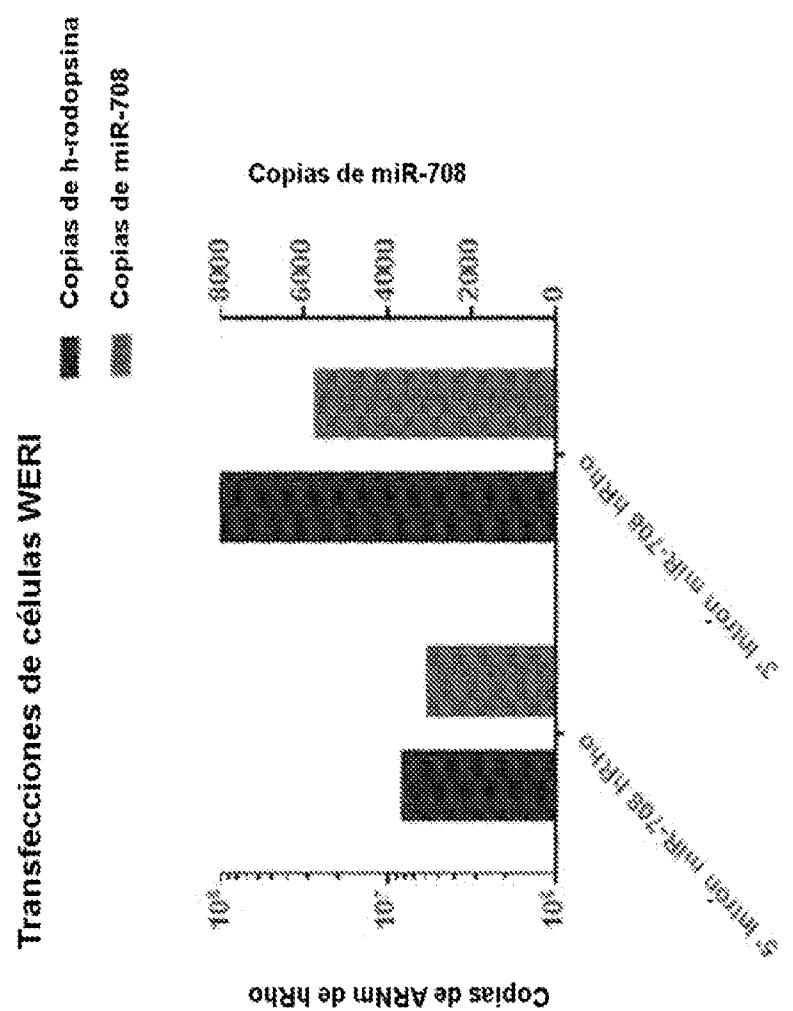


FIG. 18

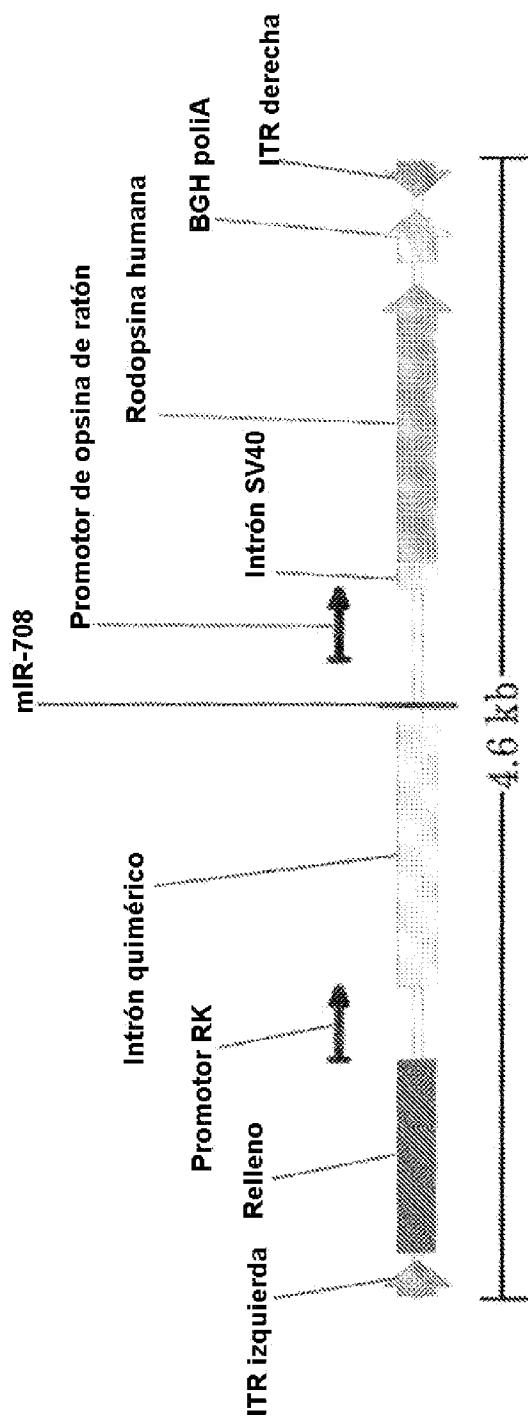


FIG. 19

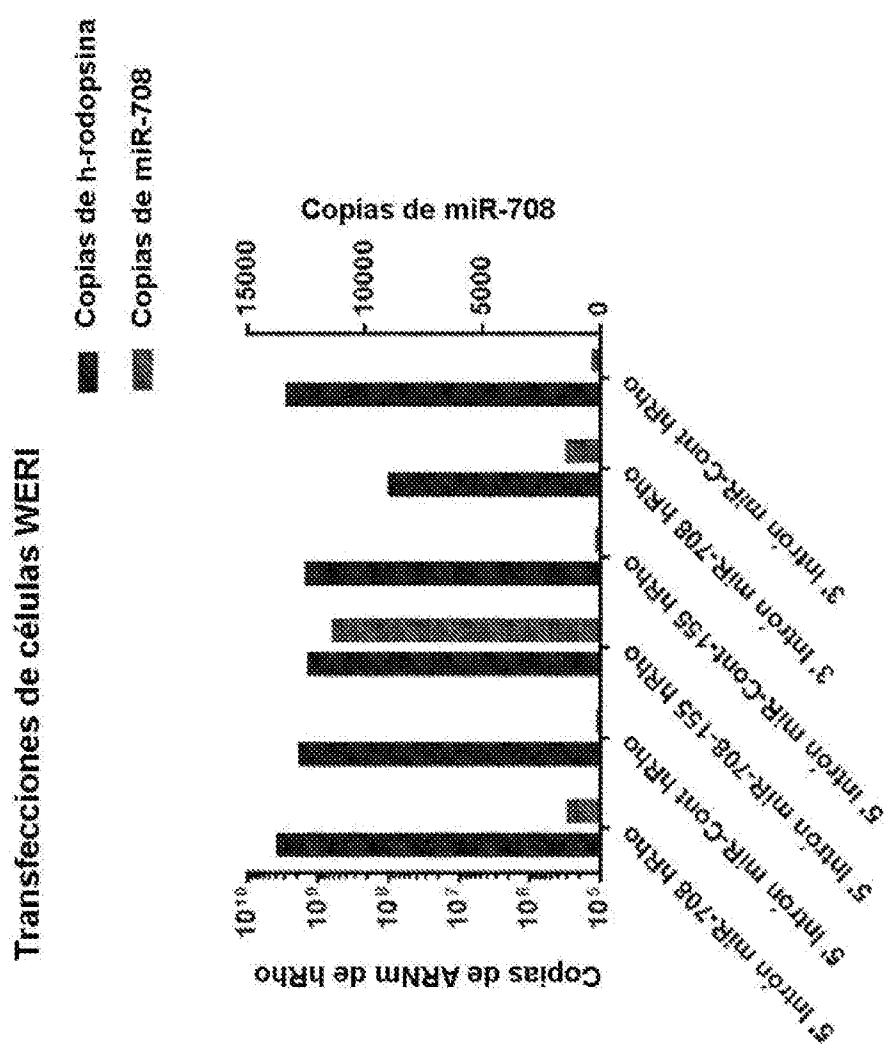


FIG. 20

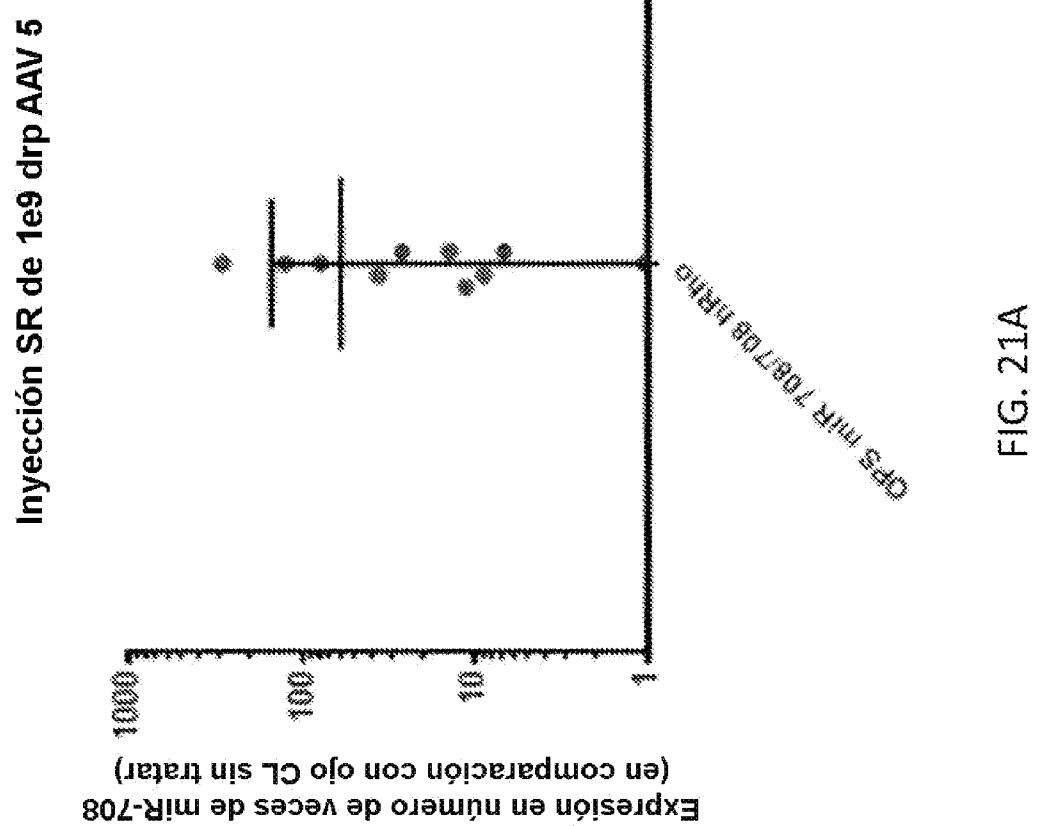


FIG. 21A

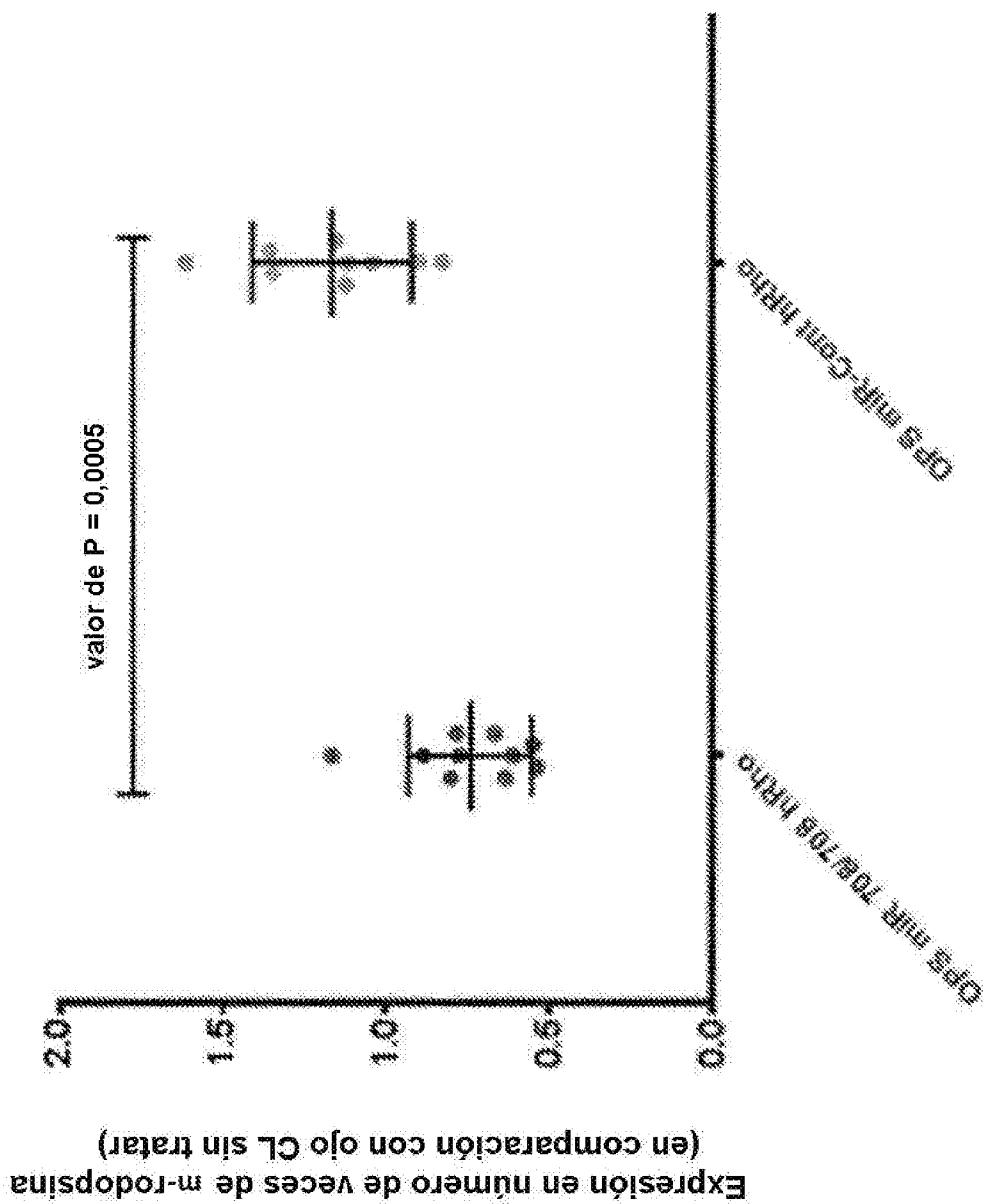
Inyección SR de 10^9 drp AAV 5

FIG. 21B

Inyección SR de 1e9 drp AAV 5

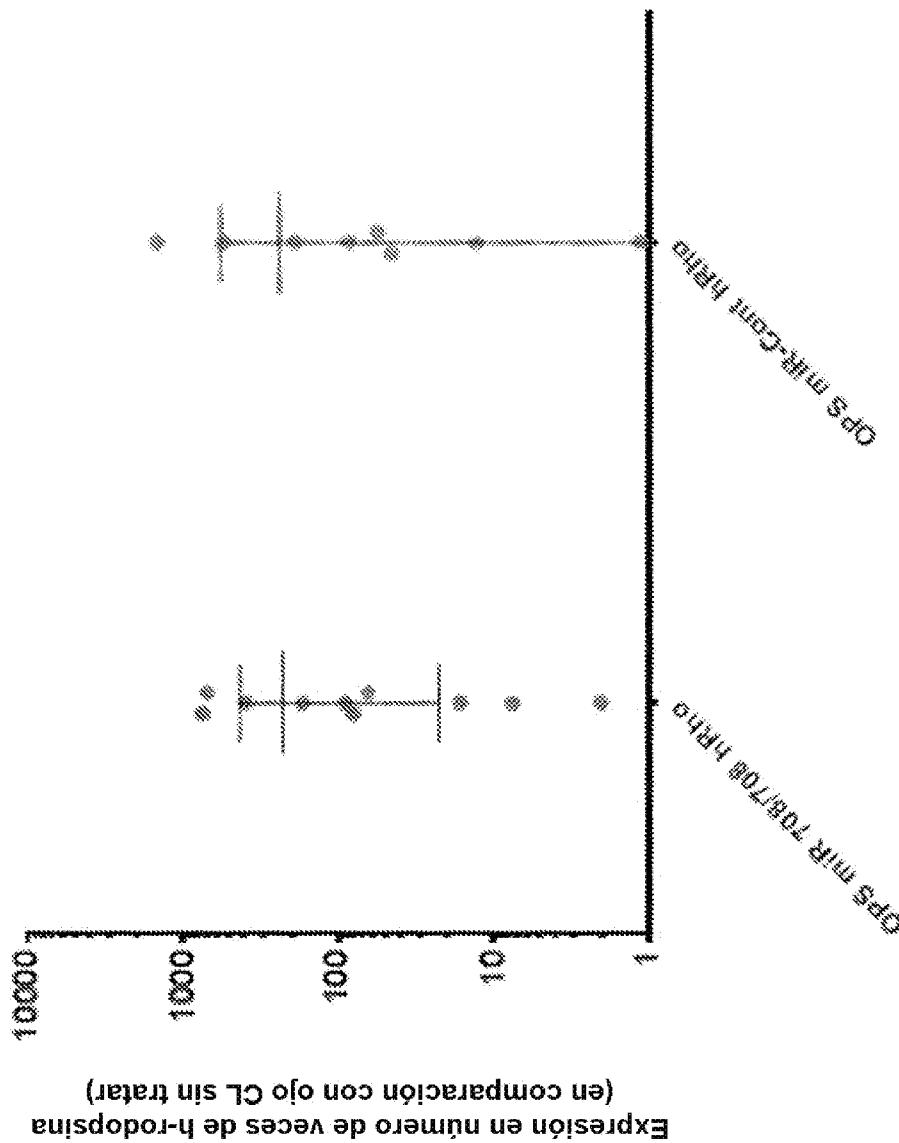


FIG. 21C

Factor de cremallera de leucina básica de la retina neural (Bastón específico)

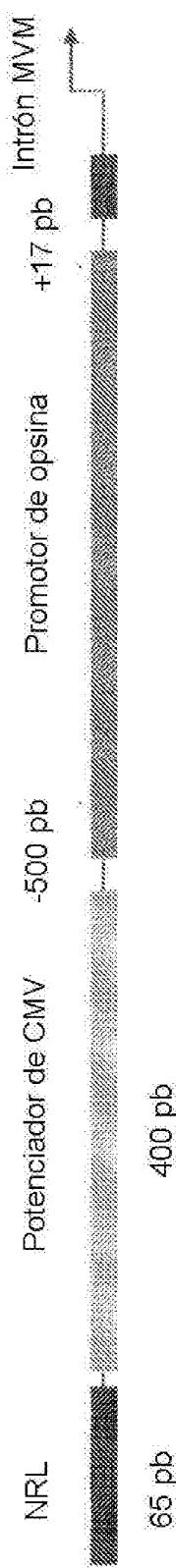


FIG. 22

Secuencia de bucle

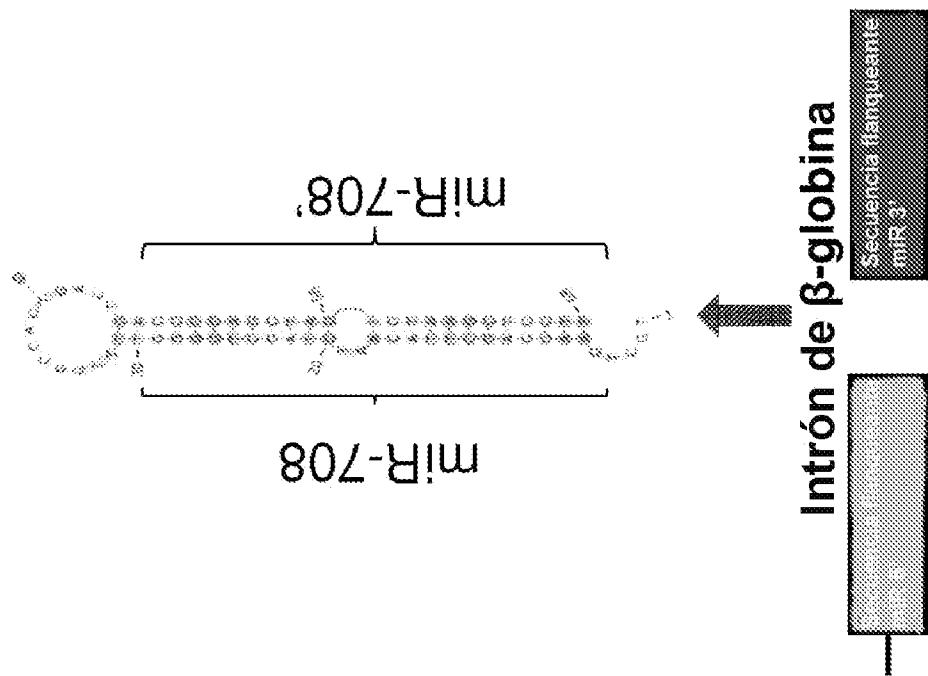


FIG. 23A

FIG. 23B

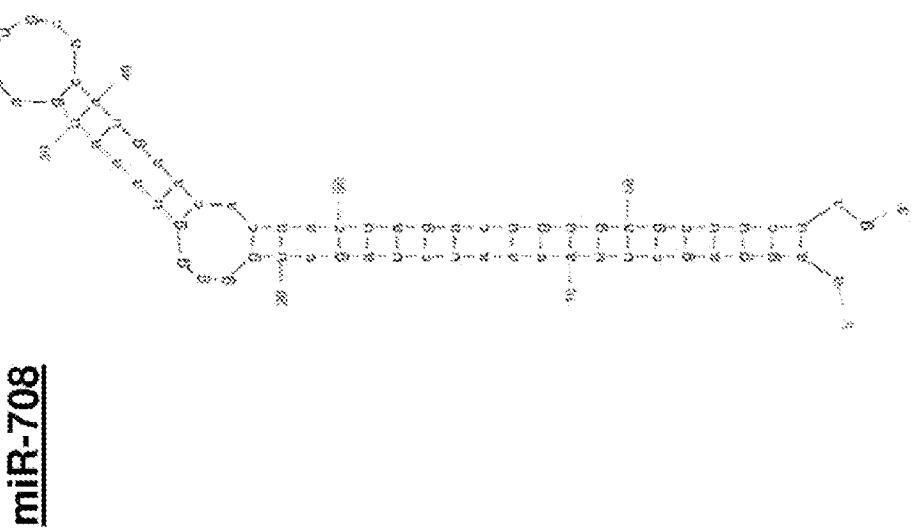


FIG. 23C

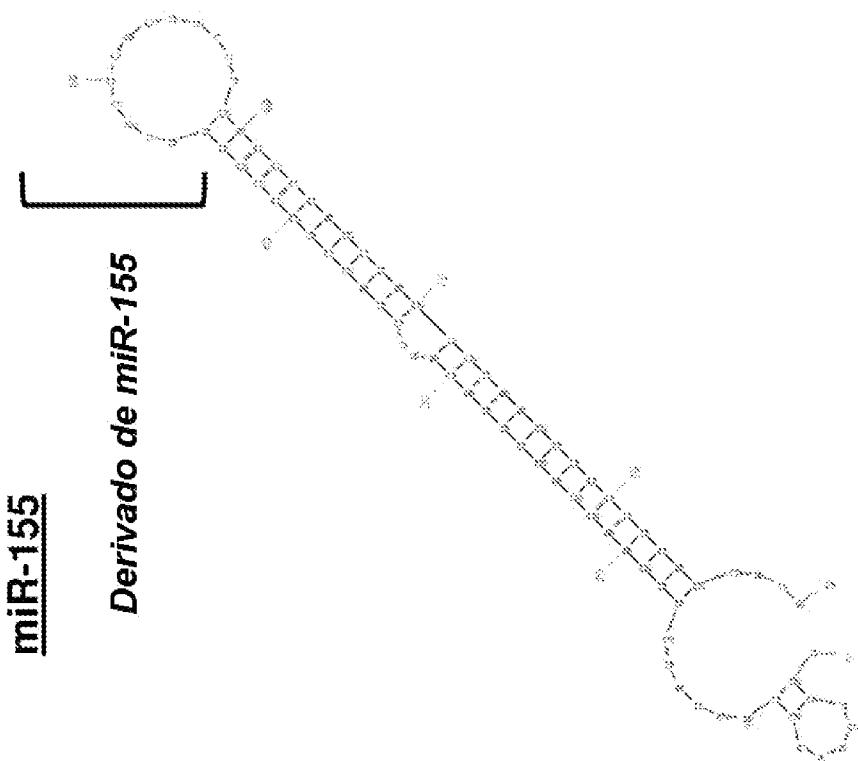


FIG. 23B Y 23C

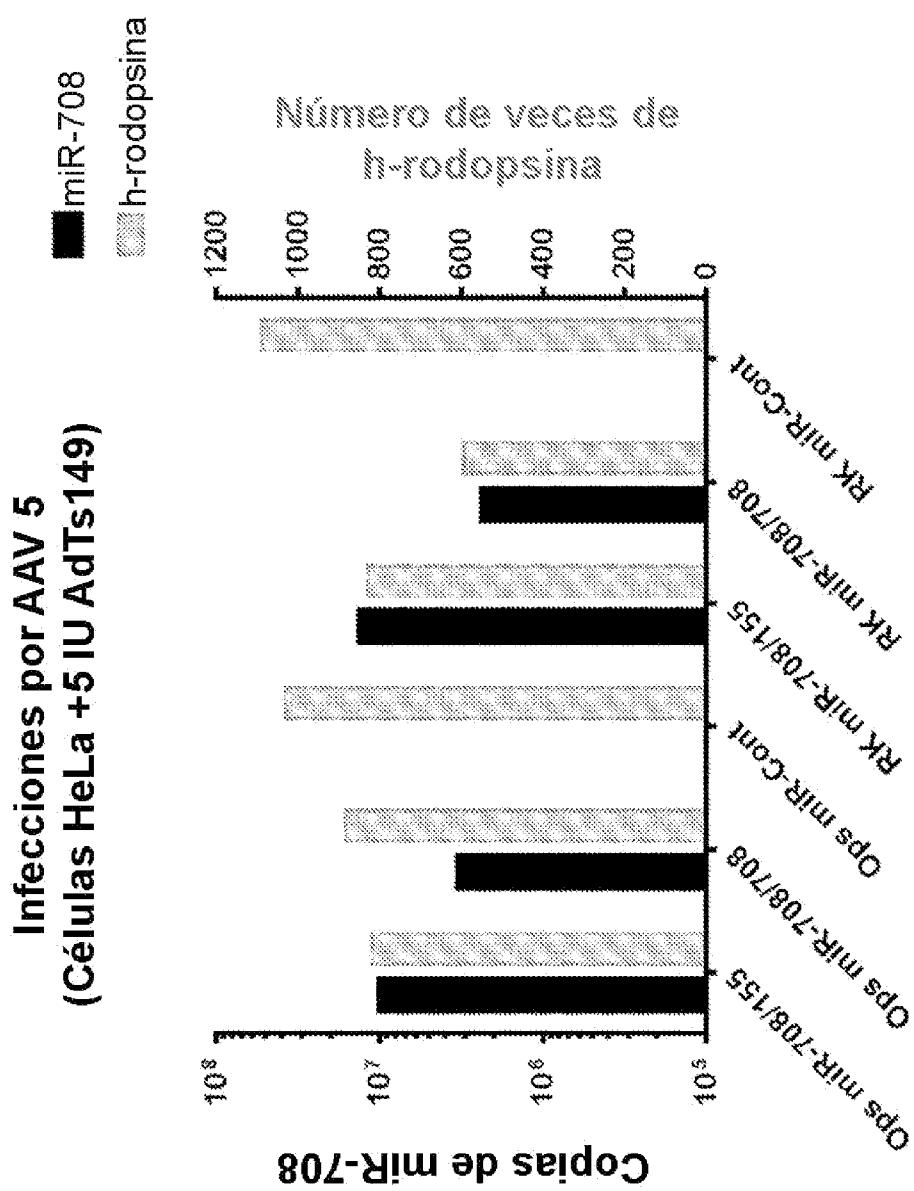


FIG. 24