

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 090**

51 Int. Cl.:

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 15/861** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2015** **E 20199208 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2024** **EP 3821912**

54 Título: **Terapia génica con RPGR para retinitis pigmentosa**

30 Prioridad:

**24.07.2014 US 201462028638 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la  
traducción de la patente:  
**13.11.2024**

73 Titular/es:

**MASSACHUSETTS EYE & EAR INFIRMARY  
(33.3%)  
243 Charles Street  
Boston, MA 02114, US;  
UCL BUSINESS LTD (33.3%) y  
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF  
AMERICA AS REPRESENTED BY THE  
SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND  
HUMAN SERVICES (33.3%)**

72 Inventor/es:

**SANDBERG, MICHAEL A;  
PAWLYK, BASIL;  
LI, TIANSEN;  
SHU, XINHUA;  
WRIGHT, ALAN FINLAY y  
ALI, ROBIN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones:

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

ES 2 987 090 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

Terapia génica con RPGR para retinitis pigmentosa

### Campo técnico

La invención se refiere a métodos para tratar un sujeto humano que tiene Retinitis Pigmentosa ligada al X (XLRP) u otra afección oftalmológica debida a la mutación de pérdida-de-función en el gen que codifica la proteína reguladora de GTPasa de retinitis pigmentosa (RPGR), y el método comprende administrar al sujeto un ácido nucleico que comprende un vector vírico adenoasociado que comprende un ADNc de RPGR humana abreviada.

### Antecedentes

La retinitis pigmentosa, (RP) es una forma importante de ceguera hereditaria en seres humanos. De los tres modos generales de herencia (dominante autosómica, recesiva autosómica, y ligada al X), RP ligada al X (XLRP) está asociada a una forma grave de la enfermedad que implica tanto fotorreceptores bastones como conos como dianas principales (Berson 1993; Sandberg et al. 2007). Más del 70 % de la RP ligada al X y 10 % - 20 % de todos los casos de RP están causados por mutaciones en el gen que codifica RPGR (Bader et al. 2003; Branham et al. 2012; Churchill et al.; Pelletier et al. 2007). Dado que actualmente se sabe que esas mutaciones en muy por encima de 100 genes causan RP y la mayor gravedad de la enfermedad ligada al X, RPGR es uno de los genes más importantes de la enfermedad de RP.

El documento WO2014011210 describe métodos de mejora de la pérdida de visión y otras afecciones asociadas a retinitis pigmentosa y retinitis pigmentosa ligada al X en un sujeto.

El documento WO0177380 describe métodos para diagnosticar una enfermedad o una predisposición a enfermedad por genotipado de un gen de RPGR de un individuo e identificación de la presencia de una o más mutaciones causantes de la enfermedad.

El documento WO0138578 describe métodos para identificar perros que tienen atrofia de retina progresiva ligada al X (XLPRA) mediante ensayo de una muestra biológica con marcadores genéticos que se segregan conjuntamente con un locus del gen de XLPRA.

Pawlyk *et al.* (2016) describe rescate de fotorreceptor por un gen de RPGR humana abreviada en un modelo murino de retinitis pigmentosa ligada al X.

Hong *et al.* (2000) describe que una variante RPGR-ORF15 abreviada única reconstituye la función de RPGR *in vivo*.

El gen de (RPGR)-ORF15 del regulador de GTPasa de retinitis pigmentosa humano (SEQ ID: 5) se da en un N.º de acceso de Geneseq BCK76671.

La proteína del regulador de GTPasa de retinitis pigmentosa humano (RPGR)-ORF15 (SEQ: 6) es dado en Geneseq, N.º de acceso BCK76672.

### Sumario

La presente invención se basa en el descubrimiento de una forma abreviada de RPGR humana que recrea con éxito la actividad de RPGR funcional, y por tanto incluye los ácidos nucleicos para su uso en los métodos para tratar sujetos que tienen RP causada por mutaciones en RPGR. Los sujetos que se pueden tratar incluyen aquellos que tienen pérdida de función visual (por ejemplo, respuesta alterada en el ensayo electroretinográfico (ERG)), pero conservan algunas células fotorreceptoras como se determina por la tomografía de coherencia óptica (OCT).

La invención está definida por las reivindicaciones. En particular, la invención proporciona un ácido nucleico que codifica una abreviatura de la proteína RPGR humana, en donde la proteína RPGR humana es al menos 95 % idéntica a la longitud completa de la SEQ ID NO:2.

También se proporciona:

un vector vírico que comprende el ácido nucleico de la invención;

una célula hospedadora aislada que comprende el vector vírico de la invención;

un ácido nucleico de la invención, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que tiene Retinitis Pigmentosa ligada al X (XLRP) u otra afección oftalmológica debida a la mutación de pérdida-de-función en el gen que codifica la proteína reguladora de GTPasa de retinitis pigmentosa (RPGR);

un vector vírico de la invención, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que tiene Retinitis Pigmentosa

ligada al X (XLRP) u otra afección oftalmológica debida a la mutación de pérdida-de-función en el gen que codifica la proteína reguladora de GTPasa de retinitis pigmentosa (RPGR); y

un vector vírico adenoasociado que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína RPGR humana abreviada, en el que la proteína RPGR humana abreviada es al menos 95 % idéntica a la longitud completa de la SEQ ID NO:2, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que tiene Retinitis Pigmentosa ligada al X (XLRP) u otra afección oftalmológica debida a la mutación de pérdida-de-función en el gen que codifica la proteína reguladora de GTPasa de retinitis pigmentosa (RPGR)

## Aspectos de la divulgación

También se divulgan métodos para tratar un sujeto humano que tiene XLRP u otra afección oftalmológica clínicamente definida debida a la mutación de pérdida-de-función en el gen que codifica la proteína reguladora de GTPasa de retinitis pigmentosa (RPGR). Los métodos incluyen administrar al sujeto un ácido nucleico que comprende un vector vírico adenoasociado que comprende un ADNc de RPGR humana abreviada, en el que el ADNc de RPGR humana abreviada codifica una proteína que es al menos 80 % idéntica a la longitud completa de la SEQ ID NO:2, opcionalmente con una delección de hasta un total de 200 aminoácidos adicionales en la región que rodea la región delecionada en la SEQ ID NO:2 (es decir, entre los aminoácidos 861 y 862 de la SEQ ID NO:2).

En algún aspecto, el ADNc de RPGR está bajo el control de un promotor de rodopsina cinasa (hRK) humana, por ejemplo, un promotor de hRK que comprende o consiste prácticamente en la SEQ ID NO:5.

En algunos aspectos, el vector vírico adenoasociado es AAV-2, serotipo-8 (AAV2/8) o AAV-8.

En algunos aspectos, el ADNc de RPGR comprende o consiste prácticamente en una secuencia que es al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO:1.

En algunos aspectos, el ADNc de RPGR humana codifica una proteína que es al menos 95 % idéntica a la longitud completa de la SEQ ID NO:2.

En algún aspecto, los métodos incluyen administrar el ácido nucleico en una dosis baja de aproximadamente  $2 \times 10^{10}$  vg/ml, una dosis media de aproximadamente  $2 \times 10^{11}$  vg/ml, o una dosis alta de aproximadamente  $2 \times 10^{12}$  vg/ml. En algún aspecto, el ácido nucleico se administra en el espacio subretiniano. En algún aspecto, se inserta una cánula de microinyección en el espacio subretiniano, temporal al nervio óptico y justo por encima de los vasos de la arcada mayor, con el fin de que el flujo de fluido pueda dirigirse hacia la mácula.

En otro aspecto, se describen los ácidos nucleicos que codifican una RPGR humana abreviada, en los que el ADNc de RPGR humana abreviada codifica una proteína que es al menos 80 % idéntica a la longitud completa de la SEQ ID NO:2, opcionalmente con una delección de hasta 200 aminoácidos adicionales que rodean la región delecionada de la SEQ ID NO:2.

En algún aspecto, el ADNc de RPGR está bajo el control de un promotor de rodopsina cinasa humana (hRK), por ejemplo, un promotor de hRK que comprende o consiste prácticamente en SEQ ID NO:5.

En algún aspecto, el ADNc de RPGR comprende o consiste prácticamente en una secuencia que es al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

En algún aspecto, el ADNc de RPGR humana codifica una proteína que es al menos 95 % idéntica a la longitud completa de la SEQ ID NO: 2.

En algún aspecto, el ADNc de RPGR humana es al menos 80 % idéntico a la longitud completa de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente con una delección de nucleótidos que codifican hasta 200 aminoácidos adicionales que rodean la región delecionada.

En el presente documento también se proporcionan vectores, por ejemplo, vectores víricos adenoasociados, por ejemplo, AAV-2, serotipo-8 (AAV2/8) o AAV-8, que comprenden los aminoácidos que codifican una RPGR humana abreviada como se describe en el presente documento, así como las células aisladas (es decir, células que no están presentes un sujeto humano vivo o animal hospedador) que albergan los ácidos nucleicos que codifican una RPGR humana abreviada y opcionalmente expresan la proteína RPGR humana abreviada.

A menos que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. En el presente documento se describen métodos y materiales para su uso en la presente invención; también pueden usarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la técnica. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y a partir de las figuras y de las reivindicaciones.

## Descripción de los dibujos

Figuras 1A-B. (A) Mapas de la región codificante de RPGR ORF15 humana nativa y ambas formas acortadas de ADNc de ORF15 humana administrado por AAV. (B) Inmunotransferencias para las dos formas recombinantes de *RPGR-ORF15* humano. La administración por AAV del ADNc humano de delección pequeña (*AAV-ORF15-L*, "forma larga") conduce a la expresión de una proteína RPGR-ORF15 humana de aproximadamente 160 kD de tamaño. La administración por AAV del ADNc humano de delección grande (*AAV-ORF15-S*, "forma corta") conduce a la expresión de una proteína de aproximadamente 130 kD de tamaño. Ambas formas de la proteína RPGR-ORF15 humana son más pequeñas que la RPGR-ORF15 humana endógena encontrada en el tejido retiniano humano (aproximadamente 200 kD).

Figuras 2A-D. Expresión de RPGR ORF15 en retinas de ratón *RPGR*<sup>-/-</sup> después de la administración subretiniana de *AAV-RPGR ORF15*. (A) Imágenes de fluorescencia de tanto las formas cortas (ORF15-S) como las largas (ORF15-L) de la expresión de la proteína RPGR ORF15 humana superpuesta sobre las imágenes Nomarski para ilustrar las capas de la retina externa. La tinción de secciones retinianas congeladas no fijadas se realizó 3 semanas después del tratamiento a los 1-2 meses de vida. (B) Imágenes de fluorescencia de ambas formas de RPGR ORF15 humana localizada conjuntamente con rootletina. Análogamente al WT, ambas formas de RPGR ORF15 humana correctamente se localizaron en el cilio conector del fotorreceptor justo distal a la rootletina. RPE, epitelio pigmentario retiniano; OS, segmento externo; CC (TZ), cilio conector (zona de transición); IS, segmento interno; ONL, capa nuclear externa. (C) Relación de las partículas fluorescentes de hRPGR y las fibras de rootletina fluorescentes en el cilio conector para ojos *Rpgr*<sup>-/-</sup> (n=3) tratados con ORF15-S, ojos *Rpgr*<sup>-/-</sup> (n=3) tratados con ORF15-L y ojos wt (n=3). Los recuentos se obtuvieron para tanto rootletina dentro del segmento interno como RPGR justo distal a la rootletina por una longitud de 100 µm de retina periférica media. Los valores son las medias ± 1 error estándar. (D) Patrón de expresión de la proteína ORF15 de forma corta y larga en secciones de retina flotantes fijadas de ratones *Rpgr*<sup>-/-</sup>. Las secciones se tiñeron para la localización de la proteína RPGR ORF15 humana 4-6 semanas después del tratamiento a las 2-3 semanas de vida. En retina de wt, la proteína RPGR ORF15 murina se vio como una señal (puntos) fluorescente verde discreta que ocupaba la región entre los segmentos internos y externos del fotorreceptor, al nivel de la zona de transición o cilio conector. Por el contrario, la señal fluorescente para la forma corta de ORF15 (*AAV-ORF15-S*) no se limita al nivel del cilio conector del fotorreceptor, sino que también se ve como una señal difusa por todos los segmentos internos y externos. La señal fluorescente para la forma larga de ORF15 muestra muy poca, si alguna localización errónea, y está muy limitada a la región del cilio conector similar a OS, segmento externo; CC (TZ), cilio conector (zona de transición); IS, segmento interno; ONL, capa nuclear externa de wt.

Figura 3. Análisis inmunohistoquímico (amarillo en el original) de fotorreceptores bastones y conos en las retinas de ratón *RPGR*<sup>-/-</sup> tratadas (forma corta y larga de ORF 15) y control a los 13 meses de vida (6 meses después de la inyección). En la retina de ratón *RPGR*<sup>-/-</sup> tratada con la forma corta de ORF15 (*AAV8-ORF15-s*), los patrones de tinción de la localización errónea de rodopsina y opsina de cono (conos S y M mezclados en la retina inferior) son prácticamente indistinguibles de los vistos en la retina control. Indicar la localización errónea de la opsina de cono en los segmentos internos y la capa sináptica en ambas de estas retinas de ratón. De manera similar, los segmentos externos de bastones y conos se acortan y desorganizan con una capa nuclear externa reducida en comparación con una retina de wt emparejada por la edad. Por el contrario, en la retina de ratón *RPGR*<sup>-/-</sup> tratada con la forma larga de ORF15 (*AAV8-ORF15-l*) la rodopsina muestra partición de segmento externo similar a la retina de ratón WT. También en la retina tratada con la forma larga de ORF15 los segmentos externos de los bastones de la retina tratada son más largos y están bien organizados y la ONL es más gruesa en comparación con la retina control. La tinción de opsina de cono muestra fotorreceptores conos más numerosos con segmentos externos alargados y bien organizados en la retina de ratón *RPGR*<sup>-/-</sup> tratada con la forma larga de ORF15 en comparación con el control.

Figuras 4A-B. Rescate de las células fotorreceptoras después del tratamiento con RPGR ORF15-l en ratones *RPGR*<sup>-/-</sup>. (A) Se muestran gráficos de barras apilados para el grosor de ONL (parte superior) y la longitud de IS/OS (parte inferior) para ojos tratados (rojo en el original) y los controles compañeros (azul en el original) en 3 ratones a los 18 meses de vida. (B) Micrografías de microscopio óptico representativas de un ratón WT y un ojo tratado con ORF15-l y el control compañero de un ratón *RPGR*<sup>-/-</sup> a los 18 meses de vida. Las imágenes se tomaron de la periferia media a lo largo del meridiano vertical en la retina superior,

Figuras 5A-C. (A) Amplitudes de onda a de bastones, onda b de bastones, y onda b de conos de 16 ratones *RPGR*<sup>-/-</sup> a los 11-14 meses de vida. Los ojos control (OD) mostraron pérdida desproporcionada de amplitud de onda b de conos en relación con la amplitud de onda b de bastones en comparación con los límites inferiores para ratones tipo silvestre. Excepto en un caso, todos los ojos tratados (OS) tenían mayores respuestas que los ojos control compañeros. En particular, hay que indicar que más de la mitad de los ojos tratados en esta edad tenían amplitudes de onda b de ERG de bastones que estaban en o por encima del límite inferior del tipo silvestre. Los valores medios para todas las tres medidas eran significativamente diferentes entre los ojos ( $P < 0,01$ ). (B) Diagrama de dispersión de la amplitud de ERG para 22 ratones *RPGR*<sup>-/-</sup> entre los 9 y 18 meses de vida sobre una escala logarítmica para la onda b adaptada a la oscuridad (bastones) (gráfica superior) y la onda b adaptada a la luz (conos) (gráfica inferior). Los puntos de datos se han desplazado ligeramente horizontalmente para cada grupo de edad para minimizar el solapamiento de datos. Las líneas de regresión para ojos tratados y control se ajustaron por regresión

longitudinal de medidas repetidas usando PROC MIXED de SAS basándose en todos los datos disponibles. (C) Formas de las ondas de ERG adaptadas a la oscuridad (DA) y adaptadas a la luz (LA) representativas de un par de ojos de RPGR-/- tratado con ORF15-I y control compañero a los 18 meses de vida. Las formas de las ondas de ERG de WT (emparejado por edad) se muestran para comparación. El ojo control ha reducido intensamente o casi ha extinguido los ERG de bastones y conos, respectivamente, en este ojo. El ojo tratado, sin embargo, aún tiene sustancial función de bastones y conos en este momento que son aproximadamente el 70 % y el 35 % de los valores de WT, respectivamente.

Figura 6. ERG de campo completo para destellos de 0,5 Hz de luz blanca y destellos de 30 Hz de la misma luz blanca de 5 pacientes con XLRP debida a mutaciones de RPGR ORF15. Tres o más señales se superponen para ilustrar la reproducibilidad. Los puntos sobre las señales designan la aparición del destello. Aunque las repuestas a las respuestas de 0,5 Hz se redujeron en solamente el 6 % al 65 % por debajo del límite inferior de lo normal (350  $\mu$ V), las respuestas a destellos de 30 Hz no eran detectables como se ilustra (es decir, sin filtro de paso banda y promedio de señal).

## Descripción detallada

La terapia génica somática mediada por vector vírico ha mostrado gran promesa en el tratamiento de modelos animales de la enfermedad degenerativa de la retina humana. Hasta ahora, ha habido un número de estudios con éxito usando administración génica mediada por virus adenoasociado (AAV) para el rescate de la degeneración del fotorreceptor en pequeños modelos animales (Ali et al. 2000; Pang et al. 2012; Pawlyk et al. 2010; Pawlyk et al. 2005; Tan et al. 2009) y modelos animales grandes (Acland et al. 2001; Alexander et al. 2007; Beltran et al. 2012; Komaromy et al. 2010; Lheriteau et al. 2009). En estos casos, el epitelio del pigmento retiniano (RPE) o los fotorreceptores han sido los objetivos principales para la expresión de transgen. Además, las pruebas clínicas en fase I que implican terapia génica para paciente con Amaurosis Congénita de Leber (LCA) que tienen como objetivo el RPE (Bainbridge et al. 2008; Cideciyan et al. 2008; Maguire et al. 2008) y más recientemente coroideremia (Maclaren et al. 2014), ya se han encontrado con algunos éxitos. Actualmente hay pruebas no clínicas que usan terapia de reemplazo génico mediado por AAV para el tratamiento de pacientes con RP ligada al X.

Los presentes inventores previamente han demostrado rescate funcional y morfológico de tanto células fotorreceptoras bastones como conos en ratones que carecen de RPGR usando una isoforma de RPGR ORF15 murina abreviada que carece de aproximadamente 600 pb en el terminal carboxilo rico en purina usando una estrategia transgénica (Hong et al. 2005). En individuos normales frecuentemente se encuentra alguna variación en la longitud de la región repetitiva (Bader et al. 2003; Jacobi et al. 2005; Karra et al. 2006). Sin embargo, no se ha descrito la función de una RPGR humana abreviada.

En el presente estudio, un gen de reemplazo *RPGR ORF15* humano acortado, conducido por un promotor de rodopsina cinasa (RK) previamente descrito (Khani et al. 2007; Sun et al. 2010) y administrado en el vector AAV8 de actuación rápida (Alloca et al. 2007; Natkunarajah et al. 2008), era capaz de rescatar el fenotipo de degeneración de fotorreceptor en el modelo de ratón con *RPGR* inactivado. La región repetitiva rica en purina del exón ORF15 es requerida para corregir la localización subcelular y la función de RPGR, pero ese acortamiento de su longitud en hasta un tercio parece no comprometer su función. Este gen de reemplazo RPGR acortado ofrece una alternativa viable al *RPGR ORF15* de "longitud completa" hasta ahora evasivo en futuras pruebas de terapia génica humana.

## RPGR

RPGR se expresa en un patrón complejo, con tanto variantes por defecto como de ORF15 que se han descrito (Vervoort et al. 2000). La forma por defecto o constitutiva de RPGR abarca los exones 1-19 y ORF15 termina en un exón alternativo grande denominado ORF15 antes del empuje de los exones 16-19. El exón de ORF15 es único en el sentido de que contiene un tramo largo de secuencia repetitiva rica en purina que resultó difícil de clonar dentro del ADNc e inestable en muchos procedimientos de manipulaciones de ADN recombinante. Aunque la forma por defecto más pequeña de RPGR es la forma predominante en tejidos con cilios móviles (Hong et al., 2003) y muchos tipos de cilios principales (nuestros datos no publicados), la isoforma ORF15 de RPGR es necesaria para la función normal de bastones y conos en la retina (Vervoort et al. 2000; Vervoort y Wright 2002) y se expresa principalmente en fotorreceptores (Hong et al. 2003). ORF15 también es un sitio común para las mutaciones en RPGR, con mutaciones identificadas en el 22-60 % de los pacientes con RP ligada al X (Breuer et al. 2002; Vervoort et al. 2000).

Los presentes inventores contribuyeron al desarrollo del primer modelo de ratón de RP ligada al X que lleva una mutación anuladora en *RPGR* sin niveles detectables de ninguna de las isoformas de RPGR (Hong et al. 2000). Los ratones sin *RPGR* ("null") manifiestan una degeneración retiniana lentamente progresiva que se caracteriza por localización errónea temprana de opsina de cono en cuerpos celulares y sinapsis y niveles reducidos de rodopsina en bastones. Como resultado, estos ratones tienen una degeneración de cono-bastón. A los 12 meses de vida la pérdida y el descenso significativos de la célula fotorreceptora en la función de conos y bastones, medido por electroretinogramas (ERG), llega a ser aparente. En la retina, RPGR se une al cilio conector del fotorreceptor localizado entre los segmentos internos y externos por una proteína de interacción con RPGR (RPGRIP1) (véase, por ejemplo, Boylan y Wright 2000; Hong et al. 2001; Roepman et al. 2000). El cilio conector es análogo a la zona de transición de cilios móviles o primarios que pueden servir como una puerta al segmento externo. El patrón de localización subcelular

y el fenotipo de ratón mutante sugiere que RPGR puede tener un papel en el tráfico proteico entre el segmento interno y externo de tanto bastones como conos (Hong y Li 2002; Hong et al. 2000; Hong et al. 2001). En intentos de desarrollar un modelo de ratón mutante de *RPGR* con un trascurso más rápido de la degeneración, se han desarrollado recientemente varias otras líneas de ratón *RPGR* (Brunner et al., 2010; Huang et al., 2012). También hay un informe reciente de un modelo de origen natural (rd9) de *RPGR* ligada al X (Thompson et al. 2012). En todos estos casos, que incluyen los ratones sin *RPGR* se muestra una pérdida lentamente progresiva de fotorreceptores, pero con grado variante de implicación de los bastones y los conos que puede ser debida, en parte, a diferencias en la tinción y/o pigmentación. Estos descubrimientos indican que la tasa lenta de degeneración en el modelo con gen inactivo ("Knockout") es debida a las diferencias de especie en lugar a la ablación que está incompleta, y confirma la aplicabilidad de este modelo murino en estudios terapéuticos de mutaciones anuladoras de *RPGR* en pacientes.

Dos variantes (A y C) de la *RPGR* humana de longitud completa (también conocida como CRD; RP3; COD1; PCDX; RP15; XLRP3; orf15; y CORDX1) están descritas en GenBank; La isoforma A está en el N.º de acceso NM\_000328.2 (ácido nucleico) y NP\_000319.1 (proteína); La isoforma C está en el N.º de acceso NM\_001034853.1 (ácido nucleico) y NP\_001030025.1 (proteína). La variante (A) usa un sitio de corte y empalme alternativo y contiene exones alternativos múltiples en la región codificante 3', en comparación con la variante C, y codifica la isoforma A (también referida como isoforma 1) que es más corta y tiene un terminal C distinto, en comparación con la isoforma C. La secuencia usada en las composiciones ilustrativas descritas en el presente documento se expone a continuación como la SEQ ID NO:1. Las secuencias de *RPGR* humana útiles en las composiciones y los métodos descritos en el presente documento pueden ser al menos 80 %, por ejemplo, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idénticas a la longitud completa de la SEQ ID NO:1, con hasta unos 50, 100, 150 o 200 aminoácidos adicionales delecionados de la región de deleción, indicados por guiones en la secuencia de a continuación.

La forma abreviada de la secuencia de *RPGRORF15* humana con 378 pb delecionados, y la región delecionada mostrada por guiones ("-"); el número de guiones no se correlaciona con el tamaño de la deleción)

```
ATGAGGGAGCCGGAAGAGCTGATGCCCGATTGGGGTCTGTGTTTACATTTGGGAAAAGTAAATTTGCT
GAAAATAATCCCGGTAAATTCTGGTTTAAAAATGATGTCCCTGTACATCTTTTCATGTGGAGATGAACAT
TCTGCTGTTGTTACCGGAAATAATAAACTTTACATGTTTGGCAGTAACAAGTGGGGTCAAGTTAGGATTA
GGATCAAAGTCAGCCATCAGCAAGCCAACATGTGTCAAAGCTCTAAAACCTGAAAAAGTGAAATTAGCT
GCCTGTGGAAGGAACACACCCTGGTGTCAACAGAAGGAGGCAATGTATATGCAACTGGTGGAAATAAT
GAAGGACAGTTGGGGCTTGGTGACACCGAAGAAAGAAACACTTTTCATGTAATTAGCTTTTTTACATCC
GAGCATAAGATTAAGCAGCTGTCTGCTGGATCTAATACTTCAGCTGCCCTAACTGAGGATGGAAGACTT
TTTATGTGGGGTGACAATTCCGAAGGGCAAATTGGTTTAAAAAATGTAAGTAATGTCTGTGTCCCTCAG
CAAGTGACCATTGGGAAACCTGTCTCCTGGATCTCTTGTGGATAATTACCATTAGCTTTTGTAAACAACA
GATGGTGAGCTATATGTGTTTGGAGAACCTGAGAATGGGAAGTTAGGTCTTCCCAATCAGCTCCTGGGC
AATCACAGAACACCCCAGCTGGTGTCTGAAATTCGGGAGAAGGTGATCCAAGTAGCCTGTGGTGGAGAG
CATACTGTGGTTCTCACGGAGAATGCTGTGTATACCTTTGGGCTGGGACAATTTGGTCAGCTGGGTCTT
GGCACTTTTCTTTTTGAACTTCAGAACCCAAAGTCATTGAGAAATTAGGGATCAAACAATAAGTTAT
```

ATTTCTTGTGGAGAAAATCACACAGCTTTGATAACAGATATCGGCCTTATGTATACTTTTGGAGATGGT  
CGCCACGGAAAAATTAGGACTTGGACTGGAGAAATTTTACCAATCACTTCATTCCCTACTTTTGTGCTCTAAT  
TTTTTGAGGTTTATAGTTAAATTGGTTGCTTGTGGTGGATGTCACATGGTAGTTTTTGTGCTCCTCAT  
CGTGGTGTGGCAAAAGAAATTGAATTCGATGAAATAAATGATACTTGCCTTATCTGTGGCGACTTTTCTG  
CCGTATAGCAGTTTAACTCAGGAAATGTACTGCAGAGGACTCTATCAGCACGTATGCGGCGAAGAGAG  
AGGGAGAGGTCTCCAGATTCTTTTTCAATGAGGAGAACACTACCTCCAATAGAAGGGACTCTTGGCCTT  
TCTGCTTGTCTTCTCCCAATTCACTCTTCCACGATGTTCTGAGAGAAACCTCCAAGAGAGTGTCTTA  
TCTGAACAGGACCTCATGCAGCCAGAGGAACCAGATTATTTGCTAGATGAAATGACCAAAGAAGCAGAG  
ATAGATAAATCTTCAACTGTAGAAAGCCTTGAGAAACTACTGATATCTTAAACATGACACACATCATG  
AGCCTGAATTCCAATGAAAAGTCATTAAATATCACCAGTTCAGAAACAAAAGAAAACAACAACAATT  
GGGGAACCTGACGCAGGATACAGCTCTTACTGAAAACGATGATAGTGATGAATATGAAGAAATGTCAGAA  
ATGAAAGAAGGGAAAGCATGTAAACAACATGTGTACACAAGGGATTTTCATGACGCAGCCAGCTACGACT  
ATCGAAGCATTTCAGATGAGGAAGTAGAGATCCCAGAGGAGAAGGAAGGAGCAGAGGATTCAAAGGA  
AATGGAATAGAGGAGCAAGAGGTAGAAAGCAATGAGGAAAATGTGAAGGTGCATGGAGGAAGAAAGGAG  
AAAACAGAGATCCTATCAGATGACCTTACAGACAAAAGCAGAGGTGAGTGAAGGCAAGGCAAAATCAGTG  
GGAGAAGCAGAGGATGGGCCTGAAGGTAGAGGGGATGGAACCTGTGAGGAAGGTAGTTTCAAGGAGCAGAA  
CACTGGCAAGATGAGGAGAGGGAGAAAGGGGGAGAAAGACAAGGGTAGAGGAGAAATGGAGAGGCCAGGA  
GAGGGAGAGAAGGAACTAGCAGAGAAGGAAGAAATGGAAGAAGAGGGATGGGGAAGAGCAGGAGCAAAAG  
GAGAGGGAGCAGGGCCATCAGAAGGAAAAGAAACCAAGAGATGGAGGAGGGAGGGGAGGAGGAGCATGGA  
GAAGGAGAAGAAGAGGAGGGAGACAGAGAAGAGGAAGAAGAGAAGGAGGGAGAAGGGAAAGAGGAAGGA  
GAAGGGGAAGAAGTGGAGGGAGAACGTGAAAAGGAGGAAGGAGAGAGGAAAAGGAGGAAGAGCGGGG  
AAGGAGGAGAAAGGAGAGGAAGAAGGAGACCAAGGAGAGGGGGAAGAGGAGGAAACAGAGGGGAGAGGG  
GAGGAAAAGAGGAGGGAGGGGAAGTAGAGGGAGGGGAAGTAGAGGAGGGGAAAGGAGAGAGGGGAAGAG  
GAAGAGGAGGAGGGTGAAGGGGAAGAGGAGGAAGGGGAGGGGAAGAGGAGGAAGGGGAGGGGGAAGAG  
GAGGAAGGAGAAGGGAAAGGGGAGGAAGAA-GGGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGGGAAGAAGAAGGGGA  
GGAAGAAGGAGAGGGAGAGGAAGAAGGGGAGGGGAGAAGGGGAGGAAGAAGAGGAAGGGGAAGTGAAGG  
GGAGGTGGAAGGGGAGGAAGGAGAGGGGGGAAGGAGAGGAAGGGAAGGAGAGGGAAGGAGAAGAAAG  
GGAAAAGGAGGGGGAAGGAGAAGAAAACAGGAGGAACAGAGAAGAGGAGGAGGAAGAAGAGGGGAAGTA  
TCAGGAGACAGGCGAAGAAGAGAATGAAAGGCAGGATGGAGAGGAGTACAAAAAGTGAAGCAAAATAAA  
AGGATCTGTGAAATATGGCAAAACATAAAACATATCAAAAAAGTCAGTTACTAACACACAGGGAAATGG  
GAAAGAGCAGAGGTCCAAATGCCAGTCCAGTCAAAACGACTTTTAAAAAATGGGCCATCAGGTTCCAA  
AAAGTTCTGGAATAATATATTACCACATTACTTGAATTGAAGTAA (SEQ ID NO:1)

La secuencia proteica para la forma abreviada de RPRORF15 humana con la región deletada mostrada por guiones ("-"; el número de guiones no se correlaciona con el tamaño de la deletación)

atgagggagccggaagagctgatgcccgatccgggtgctgtgtttacatttgggaaaagt  
M R E P E E L M P D S G A V F T F G K S  
aaatttgctgaaaataatcccggtaaattctggtttaaaatgatgtccctgtacatctt  
K F A E N N P G K F W F K N D V P V H L  
tcatgtggagatgaacattctgctgttgttacccggaataataaactttacatgtttggc  
S C G D E H S A V V T G N N K L Y M F G  
agtaacaactggggtcagtttaggattaggatcaaagttagccatcagcaagccaacatgt  
S N N W G Q L G L G S K S A I S K P T C  
gtcaaagctctaaaacctgaaaaagtgaatttagctgcctgtggaaggaaccacaccctg  
V K A L K P E K V K L A A C G R N H T L  
gtgtcaacagaaggaggcaatgtatatgcaactggtggaaataatgaaggacagttggg  
V S T E G G N V Y A T G G N N E G Q L G  
cttggtgacaccgaagaagaagaacacttttcatgtaattagcttttttacatccgagcat  
L G D T E E R N T F H V I S F F T S E H  
aagattaagcagctgtctgtgtgatctaatacttcagctgccctaactgaggatggaaga  
K I K Q L S A G S N T S A A L T E D G R  
ctttttatgtggggtgacaattccgaagggaattggtttaaaaaatgtaagtaattgtc  
L F M W G D N S E G Q I G L K N V S N V  
tgtgtccctcagcaagtgaccattgggaaacctgtctcctggatctcttgtggatattac  
C V P Q Q V T I G K P V S W I S C G Y Y  
cattcagcttttgaacaacagatgggtgagctatatgtgtttggagaacctgagaatggg  
H S A F V T T D G E L Y V F G E P E N G  
aagtttaggtcttcccaatcagctcctgggcaatcacagaacaccccagctggtgtctgaa

K L G L P N Q L L G N H R T P Q L V S E  
attccggagaaggtgatccaagtagcctgtggtggagagcatactgtggttctcacggag  
I F E K V I Q V A C G G E H T V V L T E  
aatgctgtgtatacctttgggctgggacaatttggtcagctgggtcttggcacttttctt  
N A V Y T F G L G Q F G Q L G L G T F L  
tttgaaacttcagaacccaaagtcatcgagaatattagggatcaaacaataagttatatt  
F E T S E P K V I E N I R D Q T I S Y I  
tcttggtggagaaaatcacacagccttgataacagatatcggccttatgtatacttttggg  
S C G E N H T A L I T D I G L M Y T F G  
gatgggtcgccacggaaaattaggacttgactgggagaattttaccaatcacttcattcct  
D G R H G K L G L G L E N F T N H F I P  
actttgtgctctaattttttgaggtttatagttaaattggttgcttggtggtgatgtcac  
T L C S N F L R F I V K L V A C G G C H  
atggtagtttttctgctcctcatcggtggtgggaaaaagaaattgaattcgatgaaata  
M V V F A A P H R G V A K E I E F D E I  
aatgatacttgcttatctgtggcgacttttctgccgtatagcagtttaacctcaggaaat  
N D T C L S V A T F L P Y S S L T S G N  
gtactgcagaggactctatcagcacgtatgcggcgaagagagaggggagaggtctccagat  
V L Q R T L S A R M R R R E R E R S P D  
tctttttcaatgaggagaacactacctccaatagaagggactcttggcctttctgcttgt  
S F S M R R T L P P I E G T L G L S A C  
tttctccccaattcagtcctttccacgatgttctgagagaaaacctccaagagagtgtctta  
F L P N S V F P R C S E R N L Q E S V L  
tctgaacaggacctcatgcagccagaggaaccagattatttgcctagatgaaatgacccaaa  
S E Q D L M Q P E E P D Y L L D E M T K  
gaagcagagatagataatttcttcaactgtagaaagccttggagaaaactactgatattctta  
E A E I D N S S T V E S L G E T T D I L  
aacatgacacacatcatgagcctgaattccaatgaaaagtcattaaaaattatcaccagtt  
N M T H I M S L N S N E K S L K L S P V  
cagaaacaaaagaacaacaacaattggggaaactgacgcaggatacagctcttactgaa  
Q K Q K K Q Q T I G E L T Q D T A L T E  
aacgatgatagtgatgaatatgaagaaatgtcagaaatgaaagaagggaaagcatgtaaa  
N D D S D E Y E E M S E M K E G K A C K  
caacatgtgtgcacaagggatttttcatgcagccagctacgactatcgaagcatttttca  
Q H V S Q G I F M T Q P A T T I E A F S  
gatgaggaagtagagatcccagaggagaaggaaggagcagaggattcaaaaggaaatgga  
D E E V E I P E E K E G A E D S K G N G  
atagaggagcaagaggtagaagcaaatgaggaaaaatgtgaaggtgcatggaggaagaaag  
I E E Q E V E A N E E N V K V H G G R K  
gagaaaacagagatcctatcagatgaccttacagacaaagcagagggtgagtgaaggcaag  
E K T E I L S D D L T D K A E V S E G K  
gcaaaatcagtgaggagaagcagaggatgggcctgaaggtagaggggatggaacctgtgag  
A K S V G E A E D G P E G R G D G T C E  
gaaggtagttcaggagcagaacactggcaagatgaggagaggggagaagggggagaaagac  
E G S S G A E H W Q D E E R E K G E K D  
aagggtagaggagaaatggagaggccaggagaggggagagaaggaactagcagagaaggaa  
K G R G E M E R P G E G E K E L A E K E  
gaatggaagaagagggtgagggaagagcaggagcaaaaggagaggagcagggccatcag  
E W K K R D G E E Q E Q K E R E Q G H Q  
aaggaaagaaaccaagagatggaggagggaggggaggagagcatggagaaggagaagaa  
K E R N Q E M E E G G E E E H G E G E E  
gaggagggagacagagaagaggaagaagagaaggaggggagaagggaaagaggaaggagaa  
E E G D R E E E E E K E G E G K E E G E  
ggggaagaagtgaggaggagaacgtgaaaaggaggaaggagagaggaaaaaggagggaagaa  
G E E V E G E R E K E E G E R K K E E R  
gcggggaaggagagagaaggagaggaagaaggagaccaaggagagggggaagaggaggaa  
A G K E E K G E E E G D Q G E G E E E E  
acagagggggagaggggaggaaaaagaggaggggagggggaagtagagggagggggaagtagag  
T E G R G E E K E E G G E V E G G E V E  
gaggggaaggagagaggggaagaggaagaggagggtgagggggaagaggaggaaggg  
E G K G E R E E E E E E G E G E E E E G



```

gagggggaagaggaggaaggggagggggaagaggaggaaggagaaggggaaaggggaggaa
E G E E E E G E G E E E E G E G K G E E
gaa-----ggggagggggaagaggaggaagggggaagaagaaggggag
E -----G E G E E E E E G E E E G E
gaagaaggagagggagaggaagaaggggagggagaaggggaggaagaagagggaaggggaa
E E G E G E E E G E G E G E E E E E G E
gtggaaggggaggtggaaggggaggaaggagagggggaaggagaggaagagggaagggagag
V E G E V E G E E G E G E E E E E G E
gaggaaggagaagaaggggaaaaggagggggaaggagaagaaaacaggaggaacagagaa
E E G E E R E K E G E G E E N R R N R E
gaggaggaggaagaagaggggaagtatcaggagacaggcgaagaagagaatgaaaggcag
E E E E E E G K Y Q E T G E E E N E R Q
gatggagaggagtacaaaaaagttagcaaaaataaaaggatctgtgaaatatggcaaacat
D G E E Y K K V S K I K G S V K Y G K H
aaaacatatcaaaaaaagtcagttactaacacacaggggaaatgggaaagagcagaggtcc
K T Y Q K K S V T N T Q G N G K E Q R S
aaaatgccagtcagtcacaaacgacttttaaaaaatgggccatcaggttccaaaaagttc
K M P V Q S K R L L K N G P S G S K K F
tggaataatatattaccacattacttgggaattgaagtaa (SEQ ID NO:1)
W N N I L P H Y L E L K - (SEQ ID NO:2)

```

Secuencia de ADNc de RPGRORF15 humana de longitud completa; los 378 pb deletados en la forma abreviada están en **negrita** y subrayados en la secuencia de a continuación

```

ATGAGGGAGCCGGAAGAGCTGATGCCCGATTGCGGTGCTGTGTTTACATTTGGGAAAAGTAAATTTGCT
GAAAATAATCCCGGTAAATTTCTGGTTTAAAAATGATGTCCCTGTACATCTTTCATGTGGAGATGAACAT
TCTGCTGTTGTTACCGGAAATAATAAACTTTACATGTTTGGCAGTAACAACCTGGGGTCAGTTAGGATTA
GGATCAAAGTCAGCCATCAGCAAGCCAACATGTGTCAAAGCTCTAAAACCTGAAAAAGTGAAATTAGCT
GCCTGTGGAAGGAACCAACACCCCTGGTGTCAACAGAAGGAGGCAATGTATATGCCAATGGTGGAAATAAT
GAAGGACAGTTGGGGCTTGGTGACACCGAAGAAAGAAACACTTTTTCATGTAATTAGCTTTTTCATATCC
GAGCATAAGATTAAGCAGCTGTCTGCTGGATCTAATACTTCAGCTGCCCTAACTGAGGATGGAAGACTT
TTTATGTGGGGTGACAATTCGAAGGGCAAATTTGGTTTAAAAAATGTAAGTAATGTCTGTGTCCCTCAG
CAAGTGACCATTGGGAAACCTGTCTCCTGGATCTCTTGTGGATATTACCATTGAGCTTTTGTAAACAACA
GATGGTGAGCTATATGTGTTTGGAGAACCTGAGAATGGGAAGTTAGGTCTTCCCAATCAGCTCCTGGGC
AATCACAGAACACCCAGCTGGTGTCTGAAATTCGGGAGAAGGTGATCCAAGTAGCCTGTGGTGGAGAG
CATACTGTGGTTCTCACGGAGAATGCTGTGTATACCTTTGGGCTGGGACAATTTGGTCAGCTGGGTCTT
GGCACTTTTCTTTTGAACCTTCAGAACCCAAAGTCATTGAGAATATTAGGGATCAAACAATAAGTTAT
ATTTCTTGTGGAGAAAATCACACAGCTTTGATAACAGATATCGGCCCTTATGTATACTTTTGGAGATGGT
CGCCACGGAATAATTAGGACTTGGACTGGAGAATTTTACCAATCACTTCATTCCCTACTTTTGTGCTCTAAT
TTTTTGAGGTTTATAGTTAAATTTGGTTGCTTGTGGTGGATGTCACATGGTAGTTTGTGCTGCTCCTCAT
CGTGGTGTGGCAAAGAAATGAATTCGATGAAATAAATGATACTTGCTTATCTGTGGCGACTTTTCTG
CCGTATAGCAGTTTAACTCAGGAAATGACTGCAGAGGACTCTATCAGCACGTATGCGGCGAAGAGAG
AGGGAGAGGTCTCCAGATTCTTTTCAATGAGGAGAACACTACCTCCAATAGAAGGGACTCTTGGCCCTT
TCTGCTTGTCTTCTCCCAATTCAGTCTTTCACGATGTTCTGAGAGAAACCTCCAAGAGAGTGTCTTA
TCTGAACAGGACCTCATGCAGCCAGAGGAACAGATTATTTGCTAGATGAAATGACCAAAGAAGCAGAG
ATAGATAATTCTTCACTGTAGAAAGCCTTGAGAGAACTACTGATATCTTAAACATGACACACATCATG
AGCCTGAATTCCAATGAAAAGTCATTAATAATATACACAGTTTCAGAAACAAAAGAAACAAACAATTT
GGGGAACCTGACGCAGGATACAGCTCTTACTGAAAACGATGATAGTGATGAATATGAAGAAATGTCAGAA
ATGAAGAAGGGAAAGCATGTAAACAACATGTGTCACAAGGGATTTTCATGACGCAGCCAGCTACGACT
ATCGAAGCATTTTCAGATGAGGAAGTAGAGATCCAGAGGAGAAGGAAGGAGCAGAGGATTCAAAAGGA
AATGGAATAGAGGAGCAAGAGGTAGAAGCAAATGAGGAAAATGTGAAGGTGCATGGAGGAAGAAAGGAG
AAAACAGAGATCCTATCAGATGACCTTACAGACAAAGCAGAGGTGAGTGAAGGCAAGGCAAAATCAGTG
GGAGAAGCAGAGGATGGGCCTGAAGGTAGAGGGGATGGAACCTGTGAGGAAGGTAGTTTACAGAGCAGAA
CACTGGCAAGATGAGGAGAGGGAGAAGGGGGAGAAAGACAAGGCTAGAGGAGAAATGGAGAGGCCAGGA
GAGGGAGAGAAGGAAGTAGCAGAGAAGGAAGAATGGAAGAAGAGGGATGGGGAAGAGCAGGAGCAAAAG
GAGAGGGAGCAGGGCCATCAGAAGGAAAGAAACCAAGAGATGGAGGAGGGAGGGGAGGAGGAGCATGGA
GAAGGAGAAGAAGAGGAGGGAGACAGAGAAGAGGAAGAAGAGAAGGAGGGAGAGGGAAGAGGAAGGA
GAAGGGGAAGAAGTGGAGGGAGAACGTGAAAAGGAGGAAGGAGAGAGGAAAAAGGAGGAAAGAGCGGGG
AAGGAGGAGAAAGGAGAGGAAGAAGGAGACCAAGGAGAGGGGGGAAGAGGAGGAAACAGAGGGGAGAGGG

```

GAGGAAAAAGAGGAGGGGAGGGGAAGTAGAGGGAGGGGAAGTAGAGGAGGGGAAAGGAGAGAGGGGAAGAG  
 GAAGAGGAGGAGGGTGAGGGGGGAAGAGGAGGAAGGGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGGGAGGGGGAAGAG  
 GAGGAAGGAGAAGGGAAAAGGGGAGGAAGAA**GGGGAAGAAGGAGAAGGGGAGGAAGAAGGGGAGGAAGGA**  
**GAAGGGGAGGGGAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGAGAAGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGAGAAGAG**  
**GAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGAGAAGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGAGAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGAAA**  
**GGGGAGGAGGAAGGAGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGGAAGGGGAGGAT**  
**GGAGAAGCGGAGCGGGGAAGAGGAGGAAGGAGAATGGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGG**  
**GAAGAGGAAGGAGAAGGGGAAGGGGAGGAAGGAGAAGGGGAGGGGGAAGAGGAGGAAGGAGAAGGGGAG**  
 GGGGAAGAGGAGGAAGGGGGAAGAAGAAGGGGAGGAAGAAGGAGAGGGAGAGGAAGAAGGGGAGGGAGAA  
 GGGGAGGAAGAAGAGGAAGGGGAAGTGGAAAGGGGAGGTGGAAAGGGGAGGAAGGAGAGGGGGAAGGAGAG  
 GAAGAGGAAGGAGAGGAGGAAGGAGAAGAAAGGGAAAAGGAGGGGGAAGGAGAAGAAAACAGGAGGAAC  
 AGAGAAGAGGAGGAGGAAGAAGAGGGGAAGTATCAGGAGACAGGCGAAGAAGAGAATGAAAGGCAGGAT  
 GGAGAGGAGTACAAAAAAGTGAGCAAAATAAAAGGATCTGTGAAATATGGCAAACATAAAACATATCAA  
 AAAAAAGTCAGTTACTACACACAGGGAATGGGAAAGAGCAGAGGTCCAAATGCCAGTCCAGTCAAAA  
 CGACTTTTAAAAAATGGGCCATCAGGTTCCAAAAAGTTCTGGAAATAATATATTACCACATTACTTGAA  
 TTGAAGTAA (SEQ ID NO:3)

Secuencia de aminoácidos de RPGRORF15 humana de longitud completa; los aminoácidos delecionados en la forma abreviada están en negrita y subrayados en la secuencia de a continuación

atgagggagccggaagagctgatgcccgattcgggtgctgtgtttacatttgggaaaagt  
 M R E P E E L M P D S G A V F T F G K S  
 aaatttgcgtgaaaataatcccggtaaattctggtttaaaaatgatgtccctgtacatctt  
 K F A E N N P G K F W F K N D V P V H L  
 tcatgtggagatgaacattctgctgtttgttaccggaaataataaaactttacatgtttggc  
 S C G D E H S A V V T G N N K L Y M F G  
 agtaacaactggggtcagttaggattaggatcaaagtcagccatcagcaagccaacatct  
 S N W G Q L G L G S K S A I S K P T C  
 gtcaaagctctaaaacgtgaaaaagtgaatttagctgcctgtggaaggaaccacaccctg  
 V K A L K P E K V K L A A C G R N H T L  
 gtgtcaacagaaggaggcaatgtatatgcaactgggtggaaataatgaaggacagttgggg  
 V S T E G G N V Y A T G G N N E G Q L G  
 cttgggtgacaccgaagaaagaaacacttttcatgtaattagcttttttacatccgagcat  
 L G D T E E R N T F H V I S F F T S E H  
 aagattaagcagctgtctgctggatctaatacttcagctgccctaactgaggatggaaga  
 K I K Q L S A G S N T S A A L T E D G R  
 ctttttatgtggggtgacaattccgaagggcaaatgggtttaaaaaatgtaagtaattgtc  
 L F M W G D N S E G Q I G L K N V S N V  
 tgtgtccctcagcaagtgaccattgggaaacctgtctcctggatctcttgtggatattac  
 C V P Q Q V T I G K P V S W I S C G Y Y  
 cattcagcttttgtacaacagatggtgagctatatgtgttttgagaacctgagaatggg  
 H S A F V T T D G E L Y V F G E P E N G  
 aagtttaggtcttcccaatcagctcctgggcaatcacagaacaccccagctggtgtctgaa  
 K L G L P N Q L L G N H R T P Q L V S E  
 attccggagaaggtgatccaagtcctgtggtggagagcatactgtggttctcacggag  
 I P E K V I Q V A C G G E H T V V L T E  
 aatgctgtgtatacctttgggctgggacaatttgggtcagctgggtcttggcacttttctt  
 N A V Y T F G L G Q F G Q L G L G T F L  
 tttgaaacttcagaacccaaagtcattgagaatattagggatcaaacaataagttatatt  
 F E T S E P K V I E N I R D Q T I S Y I  
 tcttgtggagaaaatcacacagcttttgataacagatatcggccttatgtatacttttga  
 S C G E N H T A L I T D I G L M Y T F G  
 gatggtcgccacggaaaattaggacttggactggagaattttaccaatcacttcattcct  
 D G R H G K L G L G L E N F T N H F I P  
 acttttgtgctctaattttttgaggtttatagtttaaattgggttgccttgtggtggatgtcac  
 T L C S N F L R F I V K L V A C G G C H  
 atggttagtttttgcgtgctcctcatcggtgtggcaaaagaaattgaattcgatgaaata  
 M V V F A A P H R G V A K E I E F D E I  
 aatgatacttgccttatctgtggcgacttttctgccgtatagcagtttaacctcaggaaat  
 N D T C L S V A T F L P Y S S L T S G N

gtactgcagaggactctatcagcacgtatgcggcgaagagagagggagaggtctccagat  
V L Q R T L S A R M R R R E R E R S P D  
tctttttcaatgaggagaacactacctccaatagaagggactcttggcctttctgcttgt  
S F S M R R T L P P I E G T L G L S A C  
tttctcccccaattcagtcctttccacgatgtttctgagagaaaacctccaagagagtgcttta  
F L P N S V F P R C S E R N L Q E S V L  
tctgaacaggacctcatgcagccagaggaaccagattatttgctagatgaaatgaccaa  
S E Q D L M Q P E E P D Y L L D E M T K  
gaagcagagatagataatttcttcaactgtagaaagccttggagaaactactgatatctta  
E A E I D N S S T V E S L G E T T D I L  
aacatgacacacatcatgagcctgaattccaatgaaaagtcattaaaattatcaccagtt  
N M T H I M S L N S N E K S L K L S P V  
cagaaaacaaaagaaacaaacaattgggggaactgacgcaggatacagctcttactgaa  
Q K Q K K Q Q T I G E L T Q D T A L T E  
aacgatgatagtgatgaatatgaagaaatgtcagaaatgaaagaagggaaagcatgtaa  
N D D S D E Y E E M S E M K E G K A C K  
caacatgtgtccaaagggattttctatgacgcagccagctacgactatcgaagcattttca  
Q H V S Q G I F M T Q P A T T I E A F S  
gatgaggaagtagagatcccagaggagaaggaaggagcagaggattcaaaaggaaatgga  
D E E V E I P E E K E G A E D S K G N G  
atagaggagcaagaggtagaagcaaagtagggaaaatgtgaaggtgcatggaggaagaaag  
I E E Q E V E A N E E N V K V H G G R K  
gagaaaacagagatcctatcagatgaccttacagacaaagcagaggtgagtgaaggcaag  
E K T E I L S D D L T D K A E V S E G K  
gcaaaatcagtggggagaagcagaggatgggcctgaaggtagaggggatggaacctgtgag  
A K S V G E A E D G P E G R G D G T C E  
gaaggtagttcaggagcagaacactggcaagatgaggagaggggagaagggggagaaagac  
E G S S G A E H W Q D E E R E K G E K D  
aagggtagaggagaaatggagagggccaggagaggggagagaaggaactagcagagaaggaa  
K G R G E M E R P G E G E K E L A E K E  
gaatggaagaagagggatgggggaagagcaggagcaaaaggagagggagcagggccatcag  
E W K K R D G E E Q E Q K E R E Q G H Q  
aaggaaagaaaccaagagatggaggagggaggggagggagcagatggagaaggagaagaa  
K E R N Q E M E E G G E E E H G E G E E  
gaggagggagacagagaagaggaagaagagaaggaggggagaagggaaagaggaaggagaa  
E E G D R E E E E E K E G E G K E E G E  
ggggaagaagtgaggaggagaacgtgaaaaggaggaaggagagaggaaaaaggaggaaaga  
G E E V E G E R E K E E G E R K K E E R  
gcggggaaggagggagaaaggagaggaagaaggagaccaaggagagggggaagaggaggaa  
A G K E E K G E E E G D Q G E G E E E E  
acagaggggagaggggaggaagaggagggaggggaagtagagggaggggaagtagag  
T E G R G E E K E E G G E V E G G E V E  
gaggggaaggagagaggggaagaggaagaggaggggtgagggggaagaggaggaaggg  
E G K G E E E E E G E E G E G E E G  
gagggggaagagggaggaaggggagggggaagaggaggaaggggaaggggaaggggaa  
E G E E E E G E G E E E E G E G K G E E  
gaaagggaagaaggagaaggggaggaagaaggggaggaaggagaaggggagggggaagag  
E G E E G E G E E E G E E G E G E G E E  
gaggaaggagaaggggagggaggaagaggaaggagaaggggagggaggaagaggaaggga  
E E G E G E G E E E G E G E G E E E E G  
gaaggggaggggagaagaggaaggagaaggggaggggagaagaggaggaaggagaagggaaa  
E G E G E E E G E G E G E E E E G E G K  
ggggagggaggaaggagaggaaggagaaggggagggggaagaggaggaaggagaaggggaa  
G E E E G E E E G E G E G E E E E E G E G E  
ggggagggatggagaaggggagggggaagaggaggaaggagaatgggagggggaagaggag  
G E D G E G E G E E E G E E W E G E E  
gaaggagaaggggagggggaagaggaagggaagggggaaggggaggaaggagaaggggag  
E G E G E G E E E G E G E G E E G E G E  
gggggaaggaggaaggagaaaggggagggggaagaggaggaaggggaaggaaggggag  
G E E E E G E G E G E E E E G E E E G E  
gaagaaaggagagggagaggaagaaggggaggggagaaggggaggaagaagagggaaggggaa

```

E E G E G E E E G E G E G E E E E E G E
gtggaaggggaggtggaaggggaggaaggagagggggaaggagaggaagaggaaggagag
V E G E V E G E E G E G E G E E E E G E
gaggaaggagaagaaaggggaaaaggagggggaaggagaagaaaacaggaggaacagagaa
E E G E E R E K E G E G E E N R R N R E
gaggagaggaagaagagggggaagtatcaggagacaggcgaagaagagaatgaaaggcag
E E E E E G K Y Q E T G E E E N E R Q
gatggagagggagtacaaaaaagtgagcaaaaataaaaggatctgtgaaatatggcaaacat
D G E E Y K K V S K I K G S V K Y G K H
aaaacatatcaaaaaaagtcagttactaacacacagggaaatgggaaagagcagaggtcc
K T Y Q K K S V T N T Q G N G K E Q R S
aaaatgccagtcagtcacaaacgacttttaaaaaaatggccatcaggttccaaaaagttc
K M P V Q S K R L L K N G P S G S K K F
tggaataatatattaccacattacttgaattgaagtaa (SEQ ID NO:3)
W N N I L P H Y L E L K - (SEQ ID NO:4)

```

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias pueden llevarse a cabo usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el algoritmo de Needleman y Wunsch ((1970) *J. Mol. Biol.* 48:444-453) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de programa informático GCG (disponible en Internet en [gcg.com](http://gcg.com)), usando los parámetros por defecto, por ejemplo, una matriz de puntuación Blossum62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4 y una penalización por hueco del marco de lectura de 5.

#### Promotor de RK

En algunas realizaciones de los métodos que se describen en el presente documento, se usa una construcción génica de reemplazo en la que un ADNc de RPGR humana abreviada como se describe en el presente documento se coloca bajo el control de un promotor de rodopsina cinasa humana (hRK). En algunas realizaciones, el promotor de RK es de aproximadamente 200 pb de longitud (un promotor corto derivado del gen de la rodopsina cinasa (RK), que se ha mostrado que conduce la expresión específica a células en bastones y conos (Khani et al. 2007; Sun et al., 2010; Young et al., 2003)). Una secuencia de promotor de hRK ilustrativa es -112/+87 (Khani et al., 2007):

```

GGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGTCTCTCAGGGGAAAAGTGAGGCG
GCCCTTGGAGGAAGGGGCGGGCAGAATGATCTAATCGGATTCCAAGCAGC
TCAGGGGATTGTCTTTTTCTAGCACCTTCTTGCCACTCCTAAGCGTCCTCCG
TGACCCCGGCTGGGATTTAGCCTGGTGTCTGTGTCAGCCCCGGT (SEQ ID
NO: 5)

```

#### Vectores de administración víricos

El ADNc de RPGR humana abreviada, como se ha descrito anteriormente, se empaqueta en un vector de administración, por ejemplo, un vector AAV8 o AAV2/8.

Los genes de reemplazo (ADNc) pueden administrarse en un portador eficaz, por ejemplo, cualquier formulación o composición capaz de administrar eficazmente el gen componente a las células *in vivo*. Las estrategias incluyen la inserción del gen en vectores víricos no patógenos, no replicantes, incluidos los retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adenoasociado, lentivirus y virus del herpes simple-1, o plásmidos bacterianos o eucariotas recombinantes. Los vectores víricos transfectan directamente a las células; el ADN plasmídico puede administrarse desnudo o con la ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectamina) o conjugados de polilisina derivatizados (por ejemplo, conjugados con anticuerpos), gramacidina S, envueltas víricas artificiales u otros portadores intracelulares de este tipo, así como la inyección directa de la construcción génica o precipitación de CaPO<sub>4</sub> llevada a cabo *in vivo*.

Una estrategia preferida para la introducción *in vivo* de ácido nucleico en una célula es por el uso de un vector vírico que contiene ácido nucleico, por ejemplo, un ADNc. La infección de células con un vector vírico tiene la ventaja de que una gran proporción de las células diana puede recibir el ácido nucleico. Adicionalmente, las moléculas codificadas en el vector vírico, por ejemplo, mediante un ADNc contenido en el vector vírico, se expresan eficazmente en células que han captado el ácido nucleico vírico.

Pueden usarse vectores de retrovirus y vectores de virus adenoasociados como sistema de administración génica recombinante para la transferencia de genes exógenos *in vivo*, particularmente en seres humanos. Estos vectores proporcionan una administración eficaz de genes en las células, y los ácidos nucleicos transferidos se integran de forma estable en el ADN cromosómico del hospedador. El desarrollo de líneas celulares especializadas (denominadas

"células empaquetadoras") que producen solo retrovirus con replicación defectuosa ha aumentado la utilidad de los retrovirus para la terapia génica y los retrovirus defectuosos están caracterizados para su uso en la transferencia génica con fines de terapia génica (para una revisión véase Miller, *Blood* 76:271 (1990)). Un retrovirus con replicación defectuosa puede empaquetarse dentro de viriones, que pueden usarse para infectar una célula diana a través del uso de un virus auxiliar por técnicas convencionales. Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células *in vitro* o *in vivo* con dichos virus pueden encontrarse en Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989), Secciones 9.10-9.14 y otros manuales de laboratorio convencionales. Ejemplos de retrovirus adecuados incluyen pLJ, pZIP, pWE y pEM que son conocidos por los expertos en la materia. Ejemplos de líneas de virus empaquetadores adecuadas para preparar sistemas retrovéricos tanto ecótopos como anfótopos incluyen  $\Psi$ Crip,  $\Psi$ Cre,  $\Psi$ 2 y  $\Psi$ Am. Se han usado retrovirus para introducir una diversidad de genes en muchos tipos celulares diferentes, incluidas las células epiteliales, *in vitro* y/o *in vivo* (véase por ejemplo Eglitis, et al. (1985) *Science* 230:1395-1398; Danos y Mulligan (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6460-6464; Wilson et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:3014-3018; Armentano et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6141-6145; Huber et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8039-8043; Ferry et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8377-8381; Chowdhury et al. (1991) *Science* 254:1802-1805; van Beusechem et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7640-7644; Kay et al. (1992) *Human Gene Therapy* 3:641-647; Dai et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10892-10895; Hwu et al. (1993) *J. Immunol.* 150:4104-4115; la patente de los Estados Unidos N.º 4.868.116; la patente de los Estados Unidos N.º 4.980.286; la solicitud PCT WO 89/07136; la solicitud PCT WO 89/02468; la solicitud PCT WO 89/05345; y la solicitud PCT WO 92/07573).

Otro sistema de administración de gen vírico útil en los presentes métodos utiliza vectores derivados de adenovirus. El genoma de un adenovirus puede manipularse, de modo que codifica y expresa un producto génico de interés, pero es inactivo en términos de su capacidad para replicarse en un ciclo de vida vírico lítico normal. Véanse, por ejemplo, Berkner et al., *BioTechniques* 6:616 (1988); Rosenfeld et al., *Science* 252:431-434 (1991); y Rosenfeld et al., *Cell* 68:143-155 (1992). Vectores adenovéricos adecuados derivados de la cepa de adenovirus de tipo Ad 5 dl324 u otras cepas de adenovirus (p.ej., Ad2, Ad3, o Ad7 etc.) son conocidos por los expertos en la materia. Los adenovirus recombinantes pueden ser ventajosos en ciertas circunstancias, en el sentido de que no son capaces de infectar células que no se dividen y pueden usarse para infectar una amplia diversidad de tipos celulares, incluidas las células epiteliales (Rosenfeld et al., (1992) citado anteriormente). Además, la partícula de virus es relativamente estable y susceptible de purificación y concentración, y como se ha descrito anteriormente, puede modificarse para afectar el espectro de infectividad. Adicionalmente, el ADN adenovérico introducido (y el ADN extraño contenido en el mismo) no se integra en el genoma de una célula hospedadora, pero permanece episómico, evitando de ese modo los problemas potenciales que se pueden dar como resultado de mutagénesis insercional *in situ*, en la que el ADN introducido llega a estar integrado en el genoma hospedador (por ejemplo, ADN retrovérico). Por otra parte, la capacidad de carga del genoma adenovérico para ADN extraño es grande (hasta 8 kilobases) con respecto a otros vectores de administración génica (Berkner et al., citado anteriormente; Haj-Ahmand y Graham, *J. Virol.* 57:267 (1986)).

Otro sistema más de vector vírico útil para la administración de los ácidos nucleicos es el virus adenoasociado (AAV). El virus adenoasociado es un virus defectuoso de origen natural que requiere otro virus, tal como un adenovirus o un virus del herpes, como virus auxiliar para la replicación eficaz y para un ciclo de vida productivo. (Para una revisión véase Muzyczka et al., *Curr. Topics in Micro. and Immunol.* 158:97-129 (1992). También es uno de los pocos virus que puede integrar su ADN en células que no se dividen y presenta una alta frecuencia de integración estable (véase, por ejemplo, Flotte et al., *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 7:349-356 (1992); Samulski et al., *J. Virol.* 63:3822-3828 (1989); y McLaughlin et al., *J. Virol.* 62:1963-1973 (1989). Los vectores que contienen tan poco como 300 pares de bases de AAV se pueden empaquetar y se pueden integrar. El espacio para el ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Un vector de AAV tal como el descrito en Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 5:3251-3260 (1985) puede usarse para introducir ADN en las células. Se ha introducido una diversidad de ácidos nucleicos en diferentes tipos celulares usando vectores AAV (véase, por ejemplo, Hermonat et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6466-6470 (1984); Tratschin et al., *Mol. Cell. Biol.* 4:2072-2081 (1985); Wondisford et al., *Mol. Endocrinol.* 2:32-39 (1988); Tratschin et al., *J. Virol.* 51:611-619 (1984); y Flotte et al., *J. Biol. Chem.* 268:3781-3790 (1993)).

En realizaciones preferidas, el vector de administración vírico es un virus AAV2/8 recombinante.

Antes de la administración, el producto final se someterá a una serie de etapas de ultrapurificación para encontrar los criterios de grado clínico.

#### Selección de sujeto

Los sujetos que son candidatos para los presentes métodos de tratamiento incluyen aquellos que tienen un diagnóstico de RP causada por mutaciones en el gen que codifica RPGR. Los sujetos que padecen otras afecciones clínicamente definidas oftalmológicas causadas por mutaciones en el gen que codifica RPGR, por ejemplo, distrofia de cono-bastón ligada al X, también pueden ser tratados usando los métodos descritos en el presente documento. Un diagnóstico de XLRP u otra afección oftalmológica causada por mutaciones en el gen que codifica RPGR puede realizarse usando métodos conocidos en la materia.

Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir identificar un sujeto, por ejemplo, un niño, adolescente,

o sujeto adulto joven, que tiene XLRP u otra afección oftalmológica causada por mutaciones en el gen que codifica RPGR, o que es sospechoso de tener XLRP u otra afección oftalmológica causada por mutaciones en el gen que codifica RPGR (por ejemplo, basándose en la presencia de síntomas de la afección y no otra causa obvia), y obtener una muestra que comprende ADN genómico del sujeto, detectar la presencia de una mutación en RPGR usando métodos biológicos moleculares conocidos, y seleccionar un paciente que tiene una mutación en RPGR que causa XLRP u otra afección. La detección de una mutación en RPGR puede incluir detección de una mutación en ORF15, por ejemplo, como se describe en Sandberg et al., (2007). *Invest Ophthalmol Vis. Sci.* 48, 1298-304; Dror et al., *Am. J. Hum. Genet.* Nov de 2003; 73(5): 1131-1146.

Las mutaciones en RPGR ORF15 incluyen mutaciones del marco de lectura, mutaciones terminadoras, mutaciones de corte y empalme, y mutaciones de un aminoácido. Mutaciones ilustrativas incluyen *ORF15Glu446 (1-pb-del)*, *ORF15Glu447 (2-pb-del)*, y *ORF15GLys521(1-pb-ins)*.

La detección de una mutación en RPGR también puede incluir la secuenciación de todo o parte (por ejemplo, la región ORF15) del gen de RPGR en un sujeto, y la comparación de la secuencia con una secuencia de referencia (por ejemplo, N.º de acceso GenBank NG\_009553.1), para detectar una mutación. Mutaciones del marco de lectura, mutaciones de truncamiento, mutaciones que alteran un aminoácido conservado, o mutaciones que afectan a una región reguladora (por ejemplo, promotor) pueden considerarse que son mutaciones que causan XLRP u otra afección oftalmológica como se describe en el presente documento; una alteración en la función puede confirmarse expresando el mutante *in vitro* (por ejemplo, en células de cultivo) o *in vivo* (por ejemplo, en un animal transgénico), y evaluando, por ejemplo, la función o la localización subcelular.

Los pacientes con XLRP u otra afección oftalmológica debida a mutaciones de RPGR que pueden tratarse usando un método descrito en el presente documento preferentemente conservan algunos fotorreceptores y la función visual, por ejemplo, como se mide por los ensayos convencionales de la función y el campo visual y/o Tomografía de Coherencia Óptica (OCT, por ejemplo, OCT de dominio espectral (SD-OCT)); véanse, por ejemplo, Sandberg et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:1298-1304. Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir identificar los sujetos que se han diagnosticado con XLRP u otra afección oftalmológica debida a mutaciones de RPGR, los cuales tienen una mutación confirmada en RPGR que causa su afección, y ensayar su capacidad visual y detectar la presencia de fotorreceptores centrales residuales. Sujetos, por ejemplo, niños, adolescentes, adultos jóvenes, o sujetos adultos, que pueden ser tratados usando los presentes métodos tendrán preferentemente agudeza visual de al menos 20/200 (los métodos para determinar la agudeza visual son bien conocidos en la materia; véanse, por ejemplo, Johnson, Deafness and Vision Disorders: Anatomy and Physiology, Assessment Procedures, Ocular Anomalies, and Educational Implications, Charles C. Thomas Publisher, 1999) Carlson, N.; Kurtz, D.; Heath, D.; Hines, C. *Clinical Procedures for Ocular Examination*. Appleton & Lange; Norwalk, CT. 1990) y una capa nuclear externa detectable en la fovea central (por ejemplo, al menos 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 99 % del grosor normal).

### Ejemplos

La invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

### Materiales y métodos

Se usaron los siguientes materiales y métodos en los Ejemplos expuestos a continuación.

#### Animales

La generación y el análisis de ratones *RPGR*<sup>-/-</sup> han sido previamente descritos (Hong et al. 2000). Los ratones *RPGR*<sup>-/-</sup> usados en este estudio se criaron a partir de cruce de hermanos entre machos nulicigotos para *RPGR* y hembras homocigotas (*RPGR*<sup>-/-</sup>) mantenidos en nuestra instalación institucional para animales. Los ratones WT usados en el estudio eran C57BL de Charles River Laboratory (Wilmington, MA). Los ratones se mantuvieron bajo un ciclo de iluminación de 12 h de luz/12 h de oscuridad. Los estudios se realizaron de acuerdo con la declaración ARVO para el uso de animales en investigación oftalmológica y en visión, y aprobada por el IACUC de la "Massachusetts Eye and Ear Infirmary".

#### Construcción plasmídica y producción de AAV8 recombinante

El ADNc de RPGR ORF 15 humana se amplificó a partir de ADNc retiniano humano por PCR usando cebadores diseñados para abarcar la región codificante de la isoforma RPGR ORF15 entera. Los ADNc de ORF15 de longitud completa no se obtuvieron a pesar de intentos repetidos usando una diversidad de métodos, coherentes con la experiencia de otros investigadores y la propia (Hong et al. 2005). En su lugar, obtuvimos un ADNc de ORF15 abreviada que contenía una delección dentro del marco de lectura de 314 codones larga (942 pb) en el exón de ORF15 (2.517 pb restantes) con el tamaño de la región repetitiva rica en purina (codones 696-1010del, "forma corta") (Fig. 1A). Se construyó un segundo ADNc de ORF15 a través de la manipulación de ADN recombinante que contenía una delección dentro del marco de lectura de 126 codones (378 pb) dentro de la región altamente repetitiva de exón 15 (con

3.081 pb restantes en el exón ORF15) (codones 862-988del, "forma larga"). Estos ADNc de ORF15 se secuenciaron para verificar la fidelidad. Para construir los vectores AAV, se insertaron ADNc de RPGR en el sitio de clonación múltiple del vector pAAV-RK-zsGreen parental. Los vectores pAAV-RK-mRPGR y pAAV-RK-hRPGR resultantes se empaquetaron en AAV. El vector pseudotipificado AAV2/8 se generó por transfección tripartita: (1) plásmido vector de AAV que codifica el gen de interés, (2) plásmido auxiliar de AAV pLT-RC03 que codifica proteínas Rep de AAV a partir del serotipo 2 y proteínas Cap a partir del serotipo 8 y (3) miniplásmido auxiliar de adenovirus pHGTI-Adenol en las células 293A. La transfección se realizó usando un protocolo desarrollado por Xiao y colaboradores (Xiao, et al., 1998). Dos días después de la transfección, las células se sometieron a lisis por ciclos de congelación y descongelación repetidos. Después del aclarado de los restos celulares, el componente de ácido nucleico de las células productoras de virus se elimina por tratamiento con Benzonasa. Las partículas de vector de AAV recombinante se purificaron por gradiente de densidad de iodixanol. Las partículas de vector purificadas se sometieron extensamente a diálisis frente a PBS y se valoraron por hibridación por transferencia en mancha.

#### *Inyecciones subretinianas*

Los ratones se colocaron bajo anestesia general con una inyección intraperitoneal de ketamina (90 mg/kg)/xilazina (9 mg/kg). Una solución de proparacaína al 0,5 % se aplicó a la córnea como una anestesia tópica. Las pupilas se dilataron con aplicación tópica de ciclopentolato y clorhidrato de fenilefrina. Bajo un microscopio quirúrgico oftálmico, se realizó una pequeña incisión a través de la córnea adyacente al limbo usando una aguja de calibre 18. Una aguja roma de calibre 33 fijada a una jeringuilla Halmiton se insertó a través de la incisión detrás de las lentes y se empujó a través de la retina. Todas las inyecciones se realizaron subretinalmente en una localización dentro del cuadrante nasal de la retina. Las inyecciones se realizaron subretinalmente dentro del cuadrante nasal de la retina. Cada ojo recibió o bien  $2 \times 10^9$  genoma de vector (*AAV-ORF15-L*) o  $5 \times 10^9$  genoma de vector (*AAV-ORF15-S*) en un volumen de 1  $\mu$ l. Los vectores RPGR-ORF15 se administraron al ojo izquierdo (OS, oculus sinister) y el vector control (*AAV8-RK-EGFP*) se administraron al ojo derecho (OD, oculus dexter). Estos son referidos por todo este texto como "tratados" o "control", respectivamente. Se ayudó a la visualización durante la inyección mediante la adición de fluoresceína (100 mg/ml AK-FLUOR, Alcon, Inc.) a las suspensiones del vector al 0,1 % en volumen. El examen de fondo después de la inyección encontró > 30 % de la retina separada en la mayoría de los casos, confirmando exitosa administración subretiniana. Las cohortes de ratón (n=50 total) se inyectaron al 1 mes de vida para estudios de expresión de proteína y a los 3 a 7 meses de vida (puesto que los ERG se mantuvieron normales durante este periodo de vida) para los estudios funcionales (ERG) e histológicos, antes de la importante pérdida de fotorreceptor.

#### *Histología e inmunofluorescencia*

Para tanto la microscopía óptica como la microscopía electrónica de transmisión, se fijaron ojos enucleados durante 10 minutos en formaldehído al 1 %, glutaraldehído al 2,5 % en tampón de cacodilato 0,1 M (pH 7,5). Después de la eliminación de los segmentos anteriores y las lentes, las copas ópticas se dejaron en el mismo fijador a 4 °C durante la noche. Las copas ópticas se lavaron con tampón, se fijaron posteriormente en tetróxido de osmio, se deshidrataron a través de una serie de alcohol graduada y se incrustaron en Epon. Se cortaron secciones semifinas (1  $\mu$ m) para observaciones en microscopio óptico. Para EM, se tiñeron secciones ultrafinas en acetato de uranilo y se llevaron a citrato antes del visionado sobre un microscopio electrónico JEOL 100CX.

Para la tinción de inmunofluorescencia de proteínas ciliares, los ojos se enuclearon, se congelaron de inmediato, y se seccionaron a 10  $\mu$ m de grosor en un criostato. A continuación, las secciones congeladas no fijadas se recogieron sobre vidrio y se tiñeron. Para la inmunotinción de todas las otras proteínas, se recogieron secciones retinianas flotantes y se tiñeron. Para este proceso los ojos se colocaron en fijador (formaldehído al 2 %, glutaraldehído al 0,25 %/PBS) y se eliminaron sus segmentos anteriores y las lentes. La duración de la fijación era normalmente de 20 minutos. Los tejidos fijados se sumergieron en sacarosa al 30 %/PBS durante al menos 2 horas, se congelaron de inmediato y se seccionaron igual a los tejidos no fijados. A continuación, se recogieron las secciones en tampón PBS y se mantuvieron flotando libre durante la duración del proceso de inmunotinción. Las secciones teñidas se vieron y fotografiaron sobre un microscopio confocal de barrido láser (modelo TCS SP2; Leica). Los anticuerpos usados eran RPGR de ratón (SI), RPGR C100 humana, antirosetina, 1D4 (antirodopsina), antiopsina de conos azules/verdes mezclados, y Hoechst 33342, tinción con colorante nuclear.

#### *Análisis de inmunotransferencia*

Los tejidos retinianos se homogeneizaron en tampón RIPA, se hirvieron en tampón Laemmli y se cargaron a 15  $\mu$ g/carril sobre geles SDS-PAGE al 5 %. Después de la separación en gel, las proteínas se transfirieron a membrana PVDF por electrotransfer. Las membranas se bloquearon con leche desnatada al 5 % y se incubaron con anticuerpos primarios durante la noche a temperatura ambiente. Después del lavado, las membranas se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. Se usó sustrato quimioluminiscente SuperSignal® West Pico (Pierce) para la detección. Para la normalización, se separaron muestras de proteína sobre SDS-PAGE convencional y se sondaron con un anticuerpo de transducina  $\alpha$  (regalo del Dr. Heidi Hamm, Vanderbilt University).

#### *Registro de ERG*

Los ratones se adaptaron a la oscuridad y se anestesiaron con pentobarbital sódico inyectado intraperitonealmente antes del ensayo. Ambas pupilas de cada animal se dilataron tópicamente con clorhidrato de fenilefrina y clorhidrato de ciclopentolato y, a continuación, los ratones se colocaron sobre una plataforma calentada. Las respuestas dominadas por bastón se provocaron en la oscuridad con destellos de 10  $\mu$ s de luz blanca ( $1,37 \times 10^5$  cd/m<sup>2</sup>) presentados a intervalos de 1 minuto en una cúpula de Ganzfeld. Se provocaron respuestas de cono, adaptado a luz en presencia de un fondo blanco desensibilizante de bastón de 41 cd/m<sup>2</sup> con los mismos destellos ( $1,37 \times 10^5$  cd/m<sup>2</sup>) presentados a intervalos de 1 Hz. Se hizo un seguimiento de los ERG simultáneamente de ambos ojos con un electrodo de asa de alambre de plata en contacto con cada córnea tópicamente anestesiada con clorhidrato de proparacaína y humedecida con Goniosol, con un electrodo subdérmico en el cuello como referencia; una cámara eléctricamente protegida servía como tierra.

Todas las respuestas se amplificaron diferencialmente a un aumento de 1.000 (-3 db a 2 Hz y 300 Hz; AM502, Tektronix Instruments, Beaverton, OR), se digitalizaron a resolución de 16 bit con una amplitud de entrada pico a pico ajustable (PCI-6251, National Instruments, Austin, TX), y se mostraron sobre un ordenador personal usando el programa informático habitual (Labview, versión 8.2, National Instruments). Independientemente para cada ojo, las respuestas de los conos se acondicionaron por un filtro de corte de 60 Hz y una ventana de rechazo de artefacto ajustable, se sumaron ( $n=4-20$ ) y, a continuación, se ajustaron a una función de spline cúbico con rigidez variable para mejorar la señal:ruido sin afectar a sus características temporales; de esta manera podíamos resolver las respuestas de la onda b de cono tan pequeñas como 2  $\mu$ V.

#### *Análisis estadístico*

Se usó JMP, versión 6 (SAS Institute, Cary, NC) para comparar las amplitudes de ERG transversales y los tiempos implícitos. Los Análisis de medidas repetidas con PROC MIXED OF SAS, versión 9,3 (SAS Institute) se usaron para las comparaciones histológicas y para comparar datos de ERG longitudinales de ojos tratados frente a no tratados.

#### *Pacientes*

Los datos electroretinográficos (ERG) de campo completo, obtenidos del conjunto de datos descrito por Sharon, et al (2003), para 111 pacientes con XLRP debida a mutaciones de ORF15 RPGR se revisaron para comparar las amplitudes de onda b a la luz blanca de 0,5 Hz, que reflejan la función de bastón + cono restante, y a destellos de 30 Hz de la misma luz blanca, que reflejan solamente la función de cono restante. Para determinar si tienen enfermedad de bastón-cono o cono-bastón, calculamos la relación de su amplitud a destellos de 0,5 Hz dividida por su amplitud a destellos de 30 Hz para OD y para OS; la misma relación para el límite inferior de lo normal en nuestro sistema es de  $350 \mu\text{V}/50 \mu\text{V} = 7$ . Para cuantificación más precisa de las amplitudes de respuesta a destellos de 0,5 Hz y para minimizar los posibles efectos secundarios a la degeneración de fotorreceptor primaria, nos enfocamos en aquellos pacientes ( $n=14$ ) con amplitudes a destello de 0,5 Hz  $> 50 \mu\text{V}$  que reflejaban enfermedad temprana o leve.

#### *ERG de pacientes con mutaciones ORF15*

Para los 14 pacientes con las respuestas más fuertes a destellos blancos de 0,5 Hz, que reflejan función bastón + cono restante, las amplitudes a esa condición oscilaron de 53  $\mu\text{V}$  a 329  $\mu\text{V}$  OD y de 59  $\mu\text{V}$  a 282  $\mu\text{V}$  OS. Sus amplitudes a destellos de 30 Hz de la misma luz blanca, que reflejan solamente función de conos y controladas con filtro de paso banda y promedio de señal para las amplitudes  $< 10 \mu\text{V}$ , oscilaron de 0,98  $\mu\text{V}$  a 23,5  $\mu\text{V}$  OD y de 0,95  $\mu\text{V}$  a 20  $\mu\text{V}$  OS. La relación de la amplitud de respuesta a destellos de 0,5 Hz dividida por la amplitud de respuesta a destellos de 30 Hz tenía una media  $\pm$  error estándar de  $47,0 \pm 12,7$  OD y  $48,7 \pm 13,0$  OS. Estos valores medios eran significativamente diferentes de 7,0, el valor para la relación se basó en los límites inferiores de lo normal (prueba de los rangos con signos no paramétrica,  $p = 0,0004$  OD y  $p = 0,001$  OS). En otras palabras, estos pacientes con mutaciones de ORF15 tenían pérdida notablemente desproporcionada de la función de los conos. Ejemplos de estos ERG se muestran en la Fig. 6.

#### *Ejemplo 1. Expresión mediada por AAV de RPGR ORF15 humana*

Construimos dos genes de reemplazo de RPGR ORF15 humana, uno con una delección dentro del marco de lectura de 126 codones (la forma larga, ORF15-L) y la otra con una delección dentro del marco de lectura de 314 codones (la forma corta, ORF15-S). Ambos se insertaron en un vector AAV8 bajo el control de un promotor de rodopsina cinasa humana (Fig. 1A) (Khani et al. 2007; Sun et al. 2010). La administración subretiniana de los dos genes de reemplazo de RPGR ORF15 humana (ojos izquierdos) condujo a la producción de proteínas RPGR recombinantes. Mediante transferencia Western, 2 semanas después de la administración del vector de AAV, la forma larga de ORF15 produjo una proteína de aproximadamente 160 kD mientras que la forma corta de ORF 15 produjo una proteína de aproximadamente 125 kD. Ambos productos proteicos eran más pequeños que la ORF15 nativa vista en tejido retiniano humano (aproximadamente 200 kD) (Fig. 1B C). Ambas formas de ORF15 de reemplazo aparecían como una banda única cuando se sondaban con un anticuerpo frente al terminal C de la RPGR humana. Bajo nuestras condiciones experimentales y las dosis dadas, los niveles de expresión de ORF15-S y ORF15-L eran comparables. Los ojos control (ojos derechos) recibieron AAV-GFP.



Ambas formas de ORF 15 podían verse en la retina de ratones *RPGR*<sup>-/-</sup> por tinción de inmunofluorescencia de criosecciones no fijadas (3 semanas después de las inyecciones subretinianas) y correctamente localizadas en la capa entre los segmentos internos y externos en la que residen los cilios conectores. Sin embargo, la forma corta (AAV8-ORF15-s) dio señales mucho más débiles (Fig. 2A) que la forma larga (AAV8-ORF15-l). En las áreas retinianas bien transducidas la señal de las retinas tratadas con la forma larga parecía indistinguible de la señal de WT (Fig. 2A B). La doble marcación con un anticuerpo para las raicillas ciliares, que se originan a partir de las extremidades proximales de los cuerpos basales y se extienden hacia el interior celular y así sirven como un excelente marcador para la región ciliar (Hong et al. 2003; Yang et al. 2002), confirmaron la correcta localización subcelular de la RPGR recombinante a los cilios conectores (Fig. 2B). A diferencia de la similitud en el nivel de expresión de proteína determinado por transferencia Western, solamente la forma larga de ORF 15 pareció tener una señal fuerte en cada CC correspondiente al número de raicillas, mientras que, en las retinas tratadas con la forma corta, muchas raicillas no tenían una señal de RPGR en sus extremos distales. La Figura 2C muestra un gráfico de barras que representa los recuentos de marcador de RPGR en relación con los recuentos de fibras de rootletina en retinas de ratón *RPGR*<sup>-/-</sup> tratadas con o bien la forma larga o la corta de ORF15 humana, así como en retinas de ratón tipo silvestre no tratadas. No había diferencia en las relaciones medias (recuento de señal de RPGR dividido por recuento de fibra de Rootletina) para la forma larga de ORF15 frente al tipo silvestre (método de Dunnett,  $p = 0,24$ ) pero una relación media significativamente inferior para la forma corta de ORF15 frente al tipo silvestre ( $p = 0,0019$ ).

Dado el nivel similar de expresión por inmunotransferencia, esta disparidad en la localización proteica en el cilio conector sugirió que quizás alguna fracción de la forma corta de ORF15 podría tener localización errónea en cualquier sitio dentro de los fotorreceptores. Análisis adicionales por inmunotinción de secciones retinianas fijadas, que proporcionaron mejor conservación de tejidos a costa de la fuerza de la señal, reveló un patrón de ORF15 localizado erróneamente para segmentos internos y externos de fotorreceptor para la forma corta de ORF15 (Fig. 2D). No se vio localización errónea para la forma larga de ORF15 que tenía un patrón de tinción similar a WT. Por tanto, la falta de tinción para la RPGR de forma corta en el CC es debida a una capacidad reducida para localizar o estar confinada en este compartimento subcelular, en lugar de un nivel inferior de la expresión general.

#### *Ejemplo 2. La expresión de ORF15-l humana (forma larga) en ratones sin RPGR promueve la supervivencia de bastones y conos*

Para investigar la eficacia terapéutica de los dos genes de reemplazo, evaluamos fotorreceptores de ratón *RPGR*<sup>-/-</sup> por inmunotinción para buscar las señales de mejora en la morfología de los bastones y los conos. A los 13 meses de vida (6 meses después del tratamiento) no hubo diferencias obvias en la morfología de los bastones o los conos observada con la forma corta de ORF15 humana (Fig. 3); tanto los ojos control como los tratados con la forma corta de ORF15 tenían la apariencia degenerativa típica para esta edad. Los segmentos externos de bastones y conos estaban acortados y desorganizados en comparación con los ojos de WT con localización errónea de opsina de bastón visto por toda la capa nuclear externa y localización errónea de opsina de cono adicionalmente en la capa sináptica. La capa nuclear externa, en los ojos control y tratados con la forma corta de ORF15, también se redujo de manera comparable en grosor.

Por el contrario, los ojos tratados con la forma larga de ORF15 humana tenía expresión de rodopsina en los bastones que estaba apropiadamente dividida para los segmentos externos sin señales obvias de localización errónea. De manera similar, la localización errónea de opsina de cono era rara en estos ojos tratados con la construcción de ORF15 más larga. Además, se encontró que los ojos tratados con ORF15-l tenían más bastones y conos (con segmentos externos que parecían casi normales) que los ojos control o los tratados con ORF15-S.

Basándose en estos descubrimientos se llevaron a cabo estudios longitudinales en ratones tratados con la forma larga de ORF15. Para cuantificar el alcance del rescate en ojos tratados con ORF15-1 en relación con los ojos control, medimos el grosor de la capa nuclear externa (ONL) y la longitud de los segmentos internos/externos de fotorreceptor en un par de ojos de 3 ratones *Rpgr*<sup>-/-</sup>. Estos se midieron en 3 regiones del hemisferio superior y en 3 regiones del hemisferio inferior, cada región separada por 600  $\mu\text{m}$  y que comenzaba 600  $\mu\text{m}$  a cada lado de la cabeza del nervio óptico a lo largo del meridiano vertical; Se usó regresión factorial completa de medidas repetidas a los 11 meses y los 18 meses de vida para identificar las diferencias por ojo, hemisferio, y región como efectos principales, así como sus productos vectoriales para determinar si un efecto de tratamiento varía o no geográficamente. A los 11 meses de vida, el grosor de ONL se distribuyó normalmente pero no lo hizo la longitud del segmento interno/segmento externo (ensayo de Shapiro-Wilk W de la bondad de ajuste,  $p = 0,016$ ); a los 18 meses de vida, ni el grosor de ONL ni la longitud del segmento interno/segmento externo se distribuyó normalmente ( $p = 0,0011$  y  $p = 0,0002$  respectivamente). A los 11 meses de vida, el grosor de ONL medio era significativamente mayor para los ojos tratados (48,0  $\mu\text{m}$ ) que para los ojos control (38,0  $\mu\text{m}$ ;  $p = 0,0015$ ); la longitud media del segmento interno/segmento externo también era significativamente mayor para los ojos tratados (45,1  $\mu\text{m}$ ) que los ojos control (29,5  $\mu\text{m}$ ;  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$  para rangos normalizados). Los beneficios del tratamiento con respecto al grosor de ONL y la longitud de IS/OS eran comparables para los hemisferios inferiores y superiores a esta edad. A los 18 meses de vida, las diferencias en la morfología retiniana entre los ojos del par eran incluso más marcadas: el grosor de ONL medio era de 22,8  $\mu\text{m}$  para los ojos tratados y 13,7  $\mu\text{m}$  para los ojos control ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$  para rangos normalizados), mientras que la longitud media del segmento interno/segmento externo era de 19,8  $\mu\text{m}$  para los ojos tratados y 7,3  $\mu\text{m}$  para los ojos control ( $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0001$  para rangos normalizados). A esta edad inicialmente observamos que el beneficio del

tratamiento para la longitud de IS/OS era significativamente mayor en la retina superior que en la retina inferior a los 18 meses ( $p = 0,0036$ ), pero esto no se mantuvo después de convertir la longitud a los rangos normalizados ( $p = 0,17$ ). La Figura 4A ilustra el grosor de ONL y la longitud de IS/OS por región para ojos tratados y control en los tres ratones a los 18 meses de vida.

La Figura 4B muestra micrografías de microscopía óptica representativas tomadas de un ojo tratado con ORF15-L representativo y uno control compañero a los 18 meses de vida. En la retina control, el área mejor conservada tiene solamente aproximadamente 2-3 filas de núcleos de fotorreceptores libremente dispuestos con segmentos internos/externos de fotorreceptor acortados y desorganizados. Hay que indicar que los márgenes de los segmentos internos y externos no son más distintos. La retina tratada, por otro lado, tiene aproximadamente 5-6 filas de células fotorreceptoras por toda, con segmentos internos y externos más largos, mejor organizados, y distintos.

### *Ejemplo 3. La expresión de la forma larga de RPGR ORF15 humana mejora la función de los bastones y los conos*

La función retiniana controlada por los ERG de bastones y conos de campo completo se evaluó en una cohorte ( $n=22$ ) de ratones RPGR<sup>-/-</sup> de 9 meses a 18 meses de vida. Los ratones recibieron tratamiento entre los 3 y 7 meses de vida, y los ERG de seguimiento se registraron no antes de 6 meses después de la inyección. La Figura 5A muestra las amplitudes de ERG de bastones y conos por ojo para 16 ratones que se ensayaron entre los 11 y 14 meses de vida. Los ojos control (OD) mostraron pérdida desproporcionada de la amplitud de onda b de conos en relación con la amplitud de onda b de bastones en comparación con los límites inferiores para los ratones tipo silvestre, como se observó previamente en este modelo murino de ratones RPGR<sup>-/-</sup> y la evidencia para una degeneración de cono-bastón. En todos los casos menos uno, el ojo tratado (OS) tenía una amplitud de onda a y onda b de ERG mayor en comparación con el ojo control compañero (OD), demostrando mejora de la función fotorreceptora de bastones y conos. De hecho, más de la mitad de los ojos tratados (9/16) tenían amplitudes de onda b de bastones que estaban en o por encima del límite inferior de los valores de WT emparejado por edad (línea de puntos). Los valores medios geométricos para la amplitud de onda a y onda b de ERG de bastones eran de 121  $\mu V$  OS y 65  $\mu V$  OD para la onda a y 482  $\mu V$  OS y 267  $\mu V$  OD para la onda b. Las amplitudes medias de la onda b de ERG de cono eran de 22  $\mu V$  OS y 11  $\mu V$  OD. Estos datos mostraron una mejora del 81-86 % de la función de los bastones y una mejora del 100 % de la función de los conos con tratamiento con AAV-ORF15 para este intervalo de edad.

En la cohorte completa de 22 ratones, usamos regresión longitudinal de medidas repetidas para comparar las tasas de cambio para las amplitudes de onda b de bastones y conos por ojo (Fig. 5B). Las tasas medias estimadas de cambio eran -8,6 %/mes para la amplitud de onda b de bastones de los ojos control y -3,8 %/mes para la amplitud de onda b de bastones de los ojos tratados; la diferencia entre estas dos medias era significativa ( $p=0,0001$ ). Las tasas medias estimadas de cambio eran -5,8 %/mes para la amplitud de onda b de conos de los ojos control y -0,8 %/mes para la amplitud de onda b de conos de los ojos tratados; la diferencia entre estas dos medias era también significativa ( $p<0,0001$ ). Además, se encontró que el descenso en la amplitud de onda b de los conos para los ojos tratados no era significativamente diferente de cero ( $p=0,54$ ), indicando estabilidad en la función de los conos sin progresión observable.

Los ERG de bastones y conos representativos se muestran en la Fig. 5C para ilustrar las formas de onda en ojos tratados y control, incluido un WT, a los 18 meses de vida (el momento final). La función de los bastones en los ojos control a esta edad se reduce intensamente (en el 75 %, de media), mientras que la función de los conos es mínima y en algunos casos prácticamente no detectable. Por el contrario, los ojos tratados en este momento aún tienen sustancial función de bastones y conos, aunque por debajo de lo visto en los ojos de WT.

### **Referencias**

- ACLAND GM, AGUIRRE GD, RAY J, ZHANG Q, et al. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat. Genet.* 28, 92-5.
- ALEXANDER JJ, UMINO Y, EVERHART D, CHANG B, et al. (2007). Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia. *Nat. Med.* 13, 685-7.
- ALI RR, SARRA GM, STEPHENS C, ALWIS MD, et al. (2000). Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat. Genet.* 25, 306-10.
- ALLOCCA M, MUSSOLINO C, GARCIA-HOYOS M, SANGES D, et al. (2007). Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J. Virol.* 81, 11372-80.
- BADER I, BRANDAU O, ACHATZ H, APFELSTEDT-SYLLA E, et al. (2003). X-linked retinitis pigmentosa: RPGR mutations in most families with definite X linkage and clustering of mutations in a short sequence stretch of exon ORF15. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1458-63.
- BAINBRIDGE JW, SMITH AJ, BARKER SS, ROBBIE S, et al. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* 358, 2231-9.
- BELTRAN WA, CIDECIYAN AV, LEWIN AS, IWABE S, et al. (2012). Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 2132-7.
- BERSON EL. (1993). Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 1659-76.
- BOYLAN JP, WRIGHT AF. (2000). Identification of a novel protein interacting with RPGR. *Hum. Mol. Genet.* 9,

2085-2093.

BRANHAM K, OTHMAN M, BRUMM M, KAROUKIS AJ, et al. (2012). Mutations in RPGR and RP2 Account for 15 % of Males with Simplex Retinal Degenerative Disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 8232-7.

BREUER DK, YASHAR BM, FILIPPOVA E, HIRIYANNA S, et al. (2002). A comprehensive mutation analysis of RP2 and RPGR in a North American cohort of families with X-linked retinitis pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 1545-54.

CHURCHILL JD, BOWNE SJ, SULLIVAN LS, LEWIS RA, et al. (2013). Mutations in the X-linked retinitis pigmentosa genes RPGR and RP2 found in 8.5 % of families with a provisional diagnosis of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54, 1411-6.

CIDECIYAN AV, ALEMAN TS, BOYE SL, SCHWARTZ SB, et al. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 15112-7. HONG DH, LI T. (2002). Complex expression pattern of RPGR reveals a role for purine-rich exonic splicing enhancers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 3373-82.

HONG DH, PAWLYK B, SOKOLOV M, STRISSEL KJ, et al. (2003). RPGR isoforms in photoreceptor connecting cilia and the transitional zone of motile cilia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 2413-21.

HONG DH, PAWLYK BS, ADAMIAN M, SANDBERG MA, et al. (2005). A single, abbreviated RPGR-ORF15 variant reconstitutes RPGR function *in vivo*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 435-41.

HONG DH, PAWLYK BS, SHANG J, SANDBERG MA, et al. (2000). A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 3649-54.

HONG DH, YUE G, ADAMIAN M, LI T. (2001). Retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-interacting protein is stably associated with the photoreceptor ciliary axoneme and anchors RPGR to the connecting cilium. *J. Biol. Chem.* 276, 12091-12099.

JACOBI FK, KARRA D, BROGHAMMER M, BLIN N, et al. (2005). Mutational risk in highly repetitive exon ORF15 of the RPGR multidisease gene is not associated with haplotype background. *Int. J. Mol. Med.* 16, 1175-8.

KARRA D, JACOBI FK, BROGHAMMER M, BLIN N, et al. (2006). Population haplotypes of exon ORF15 of the retinitis pigmentosa GTPase regulator gene in Germany: implications for screening for inherited retinal disorders. *Mol. Diagn. Ther.* 10, 115-23.

KHANI SC, PAWLYK BS, BULGAKOV OV, KASPEREK E, et al. (2007). AAV-Mediated Expression Targeting of Rod and Cone Photoreceptors with a Human Rhodopsin Kinase Promoter. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 3954-61.

KOMAROMY AM, ALEXANDER JJ, ROWLAN JS, GARCIA MM, et al. (2010). Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia. *Hum. Mol. Genet.* 19, 2581-93.

LHERITEAU E, LIBEAU L, STIEGER K, DESCHAMPS JY, et al. (2009). The RPGRIP1-deficient dog, a promising canine model for gene therapy. *Mol. Vis.* 15, 349-61.

MACLAREN RE, GROPE M, BARNARD AR, COTTRILL CL, et al. (2014). Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet*.

MAGUIRE AM, SIMONELLI F, PIERCE EA, PUGH EN, JR., et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* 358, 2240-8.

NATKUNARAJAH M, TRITTIBACH P, MCINTOSH J, DURAN Y, et al. (2008). Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno-associated virus serotype 2/8. *Gene Ther.* 15, 463-7.

PANG JJ, LEI L, DAI X, SHI W, et al. (2012). AAV-mediated gene therapy in mouse models of recessive retinal degeneration. *Curr. Mol. Med.* 12, 316-30.

PAWLYK BS et al. (2016). Photoreceptor rescue by an abbreviated human RPGR gene in a murine model of X-linked retinitis pigmentosa. *Gene Therapy*, vol. 23, no. 2, páginas 196 - 204.

PAWLYK BS, BULGAKOV OV, LIU X, XU X, et al. (2010). Replacement gene therapy with a human RPGRIP1 sequence slows photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis. *Hum. Gene Ther.* 21, 993-1004.

PAWLYK BS, SMITH AJ, BUCH PK, ADAMIAN M, et al. (2005). Gene replacement therapy rescues photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis lacking RPGRIP1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 3039-45.

PELLETIER V, JAMBOU M, DELPHIN N, ZINOVIEVA E, et al. (2007). Comprehensive survey of mutations in RP2 and RPGR in patients affected with distinct retinal dystrophies: genotype-phenotype correlations and impact on genetic counseling. *Hum. Mutat.* 28, 81-91.

ROEPMAN R, BERNOUD-HUBAC N, SCHICK DE, MAUGERI A, et al. (2000). The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) interacts with novel transport-like proteins in the outer segments of rod photoreceptors. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2095-2105.

SANDBERG MA, ROSNER B, WEIGEL-DIFRANCO C, DRYJA TP, et al. (2007). Disease course of patients with X-linked retinitis pigmentosa due to RPGR gene mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 1298-304.

SUN X, PAWLYK B, XU X, LIU X, et al. (2010). Gene therapy with a promoter targeting both rods and cones rescues retinal degeneration caused by AIPL1 mutations. *Gene Ther.* 17, 117-131.

TAN MH, SMITH AJ, PAWLYK B, XU X, et al. (2009). Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in AIPL1: effective rescue of mouse models of partial and complete Aipl1 deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors. *Hum. Mol. Genet.*

THOMPSON DA, KHAN NW, OTHMAN MI, CHANG B, et al. (2012). Rd9 is a naturally occurring mouse model of a common form of retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR-ORF15. *PLoS One* 7, e35865.

VERVOORT R, LENNON A, BIRD AC, TULLOCH B, et al. (2000). Mutational hot spot within a new RPGR exon in

X-linked retinitis pigmentosa. *Nature Genetics* 25, 462-466.

VERVOORT R, WRIGHT AF. (2002). Mutations of RPGR in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Hum. Mutat.* 19, 486-500.

YANG J, LIU X, YUE G, ADAMIAN M, et al. (2002). Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet. *J. Cell. Biol.* 159, 431-440.

5

# REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico que codifica una proteína de RPGR humana abreviada, en el que la proteína RPGR humana abreviada es al menos 95 % idéntica a la longitud completa de la SEQ ID NO:2.

2. El ácido nucleico de la reivindicación 1, en el que:

el ácido nucleico que codifica la proteína RPGR humana está bajo el control de un promotor de la rodopsina cinasa (hRK) humana;

en el que

(a) el promotor de hRK comprende la SEQ ID NO:5; o

(b) el promotor de hRK consiste prácticamente en la SEQ ID NO:5.

3. El ácido nucleico de la reivindicación 1 o 2, en el que el ácido nucleico codifica una proteína RPGR humana abreviada que comprende la SEQ ID NO:2.

4. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el ácido nucleico codifica una proteína RPGR humana abreviada que consiste en la SEQ ID NO: 2.

5. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el ácido nucleico que codifica la proteína RPGR humana abreviada es al menos 95 % idéntico a la longitud completa de SEQ ID NO:1.

6. El ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que tiene Retinitis Pigmentosa ligada al X (XLRP) u otra afección oftalmológica debida a la mutación de pérdida-de-función en el gen que codifica la proteína reguladora de GTPasa de retinitis pigmentosa (RPGR).

7. Un vector vírico que comprende el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

8. El vector vírico de la reivindicación 7, que es un vector vírico adenoasociado, opcionalmente en el que el vector vírico adenoasociado es AAV2 o AAV8.

9. El vector vírico de la reivindicación 8, en el que el vector vírico adenoasociado es AAV2/8.

10. El vector vírico de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que tiene Retinitis Pigmentosa ligada al X (XLRP) u otra afección oftalmológica debida a la mutación de pérdida-de-función en el gen que codifica la proteína reguladora de GTPasa de retinitis pigmentosa (RPGR).

11. Una célula hospedadora aislada que comprende el vector vírico de las reivindicaciones 7 a 9 o el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

12. La célula hospedadora aislada de la reivindicación 11, en la que la célula expresa la proteína RPGR humana abreviada.

13. Un vector vírico adenoasociado que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína RPGR humana abreviada, en el que la proteína RPGR humana abreviada es al menos 95 % idéntica a la longitud completa de la SEQ ID NO:2, para su uso en el tratamiento de un sujeto humano que tiene Retinitis Pigmentosa ligada al X (XLRP) u otra afección oftalmológica debida a la mutación de pérdida-de-función en el gen que codifica la proteína reguladora de GTPasa de retinitis pigmentosa (RPGR).

14. El vector vírico para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en el que el ácido nucleico que codifica la proteína RPGR humana abreviada está bajo control de un promotor de rodopsina cinasa humana (hRK).

15. El vector vírico para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en el que:

(a) el promotor de hRK comprende o consiste prácticamente en la SEQ ID NO:5; y/o

(b) el ácido nucleico que codifica la proteína RPGR humana abreviada comprende o consiste prácticamente en una secuencia que es al menos 95 % idéntica a la SEQ ID NO:1.

16. El vector vírico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el vector vírico adenoasociado es AAV2 o AAV8.

17. El vector vírico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el vector vírico adenoasociado es AAV2/8.

18. El vector vírico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que la proteína RPGR humana abreviada consiste en SEQ ID NO:2.

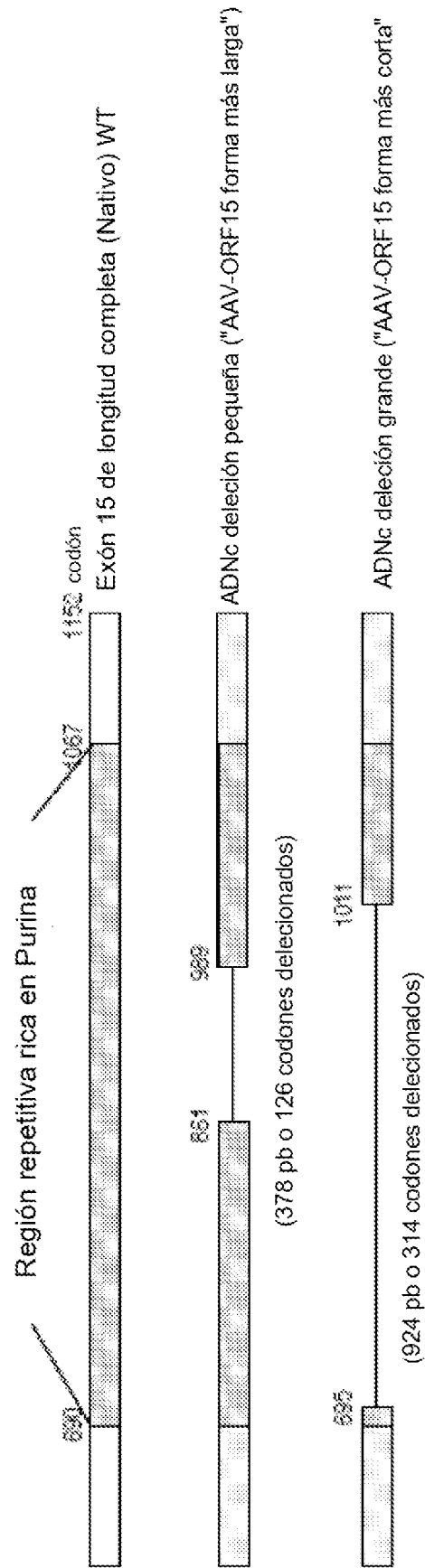
5 19. El vector vírico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 18, en el que la proteína RPGR humana abreviada consiste en SEQ ID NO: 2.

20. El vector vírico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 19;

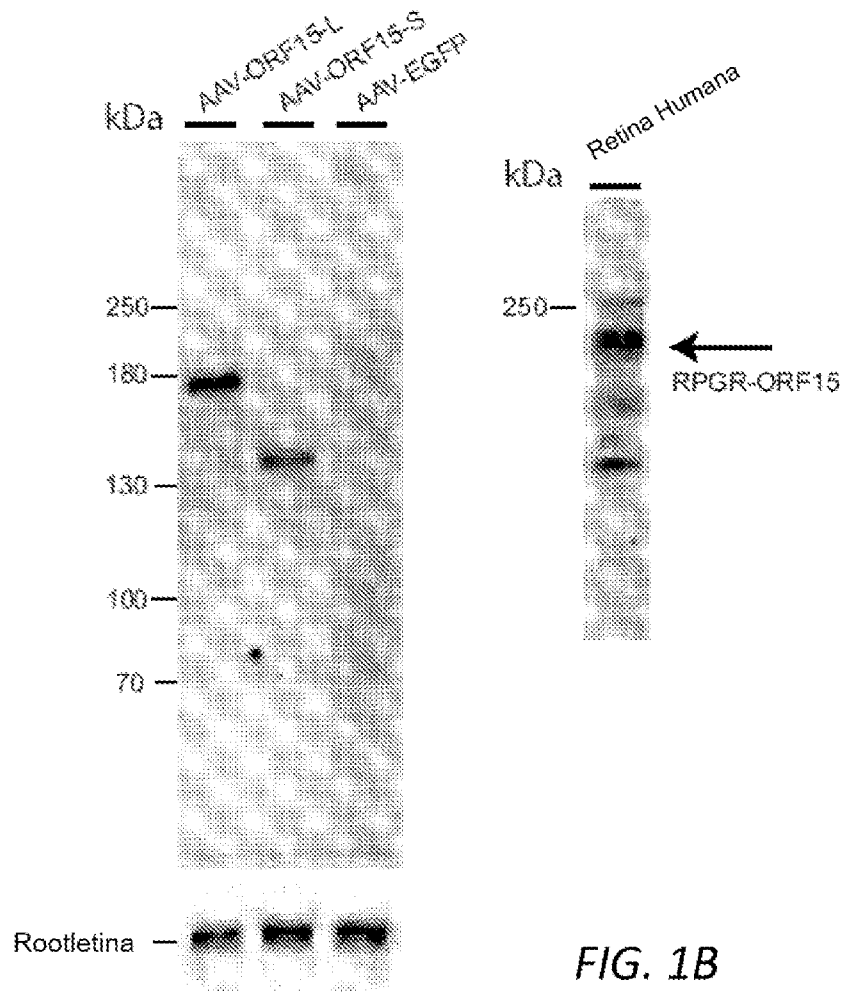
10 (a) en el que el uso comprende administrar el ácido nucleico en una dosis baja de aproximadamente  $2 \times 10^{10}$  vg/ml, una dosis media de aproximadamente  $2 \times 10^{11}$  vg/ml, o una dosis alta de aproximadamente  $2 \times 10^{12}$  vg/ml; y/o  
(b) en el que el ácido nucleico se administra en el espacio subretiniano;

15 en el que opcionalmente se inserta una cánula de microinyección en el espacio subretiniano, temporal al nervio óptico y justo por encima de los vasos de la arcada mayor, con el fin de que el flujo de fluido pueda dirigirse hacia la mácula.

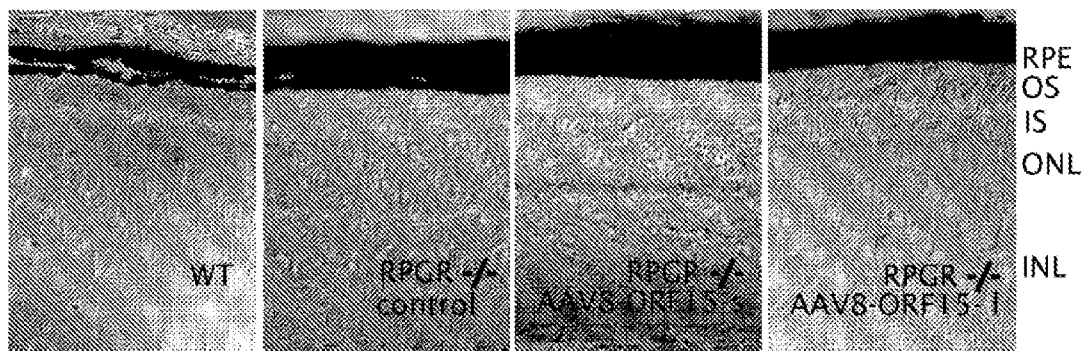
# **RPGR ORF15 Humana, Exón 15**



**FIG. 1A**



### RPGR ORF15





# RPGR/Rootletina

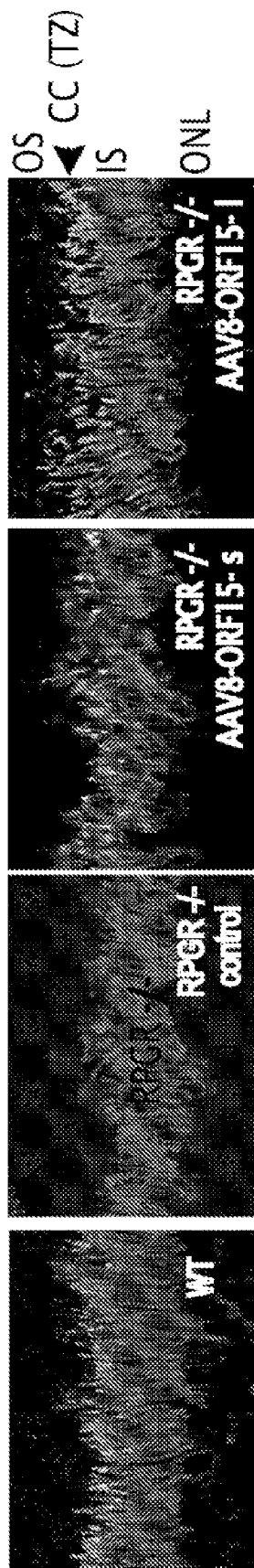


FIG. 2B

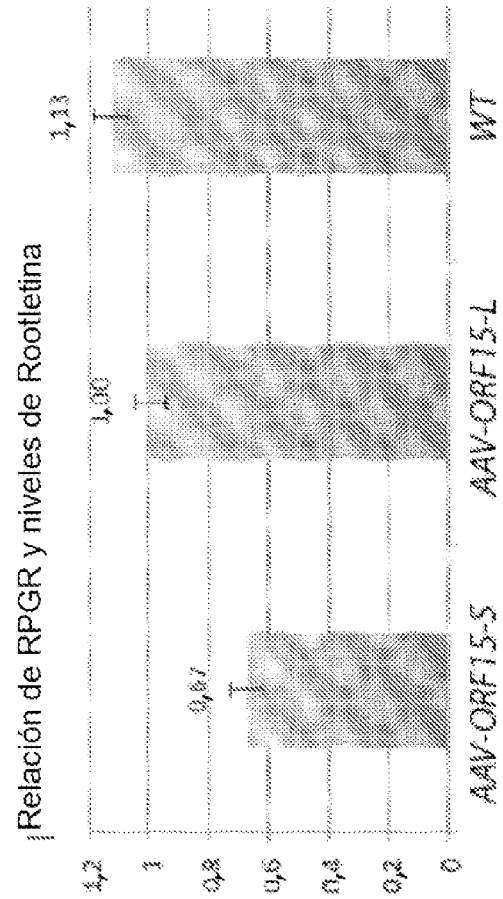


FIG. 2C

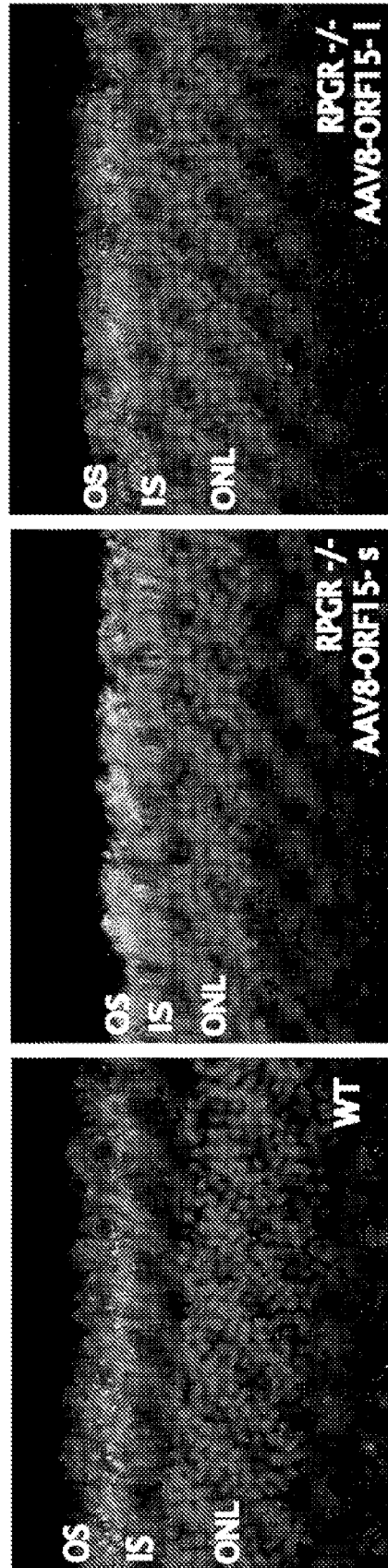


FIG. 2D

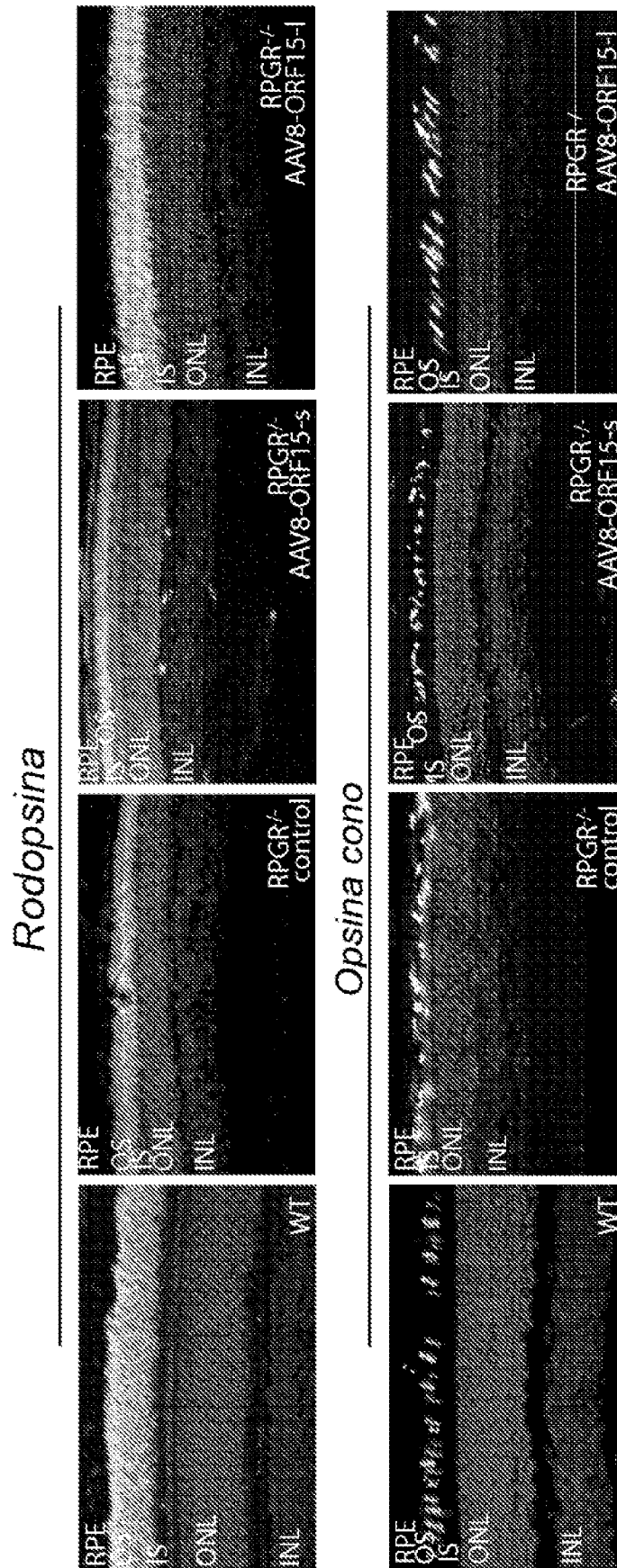
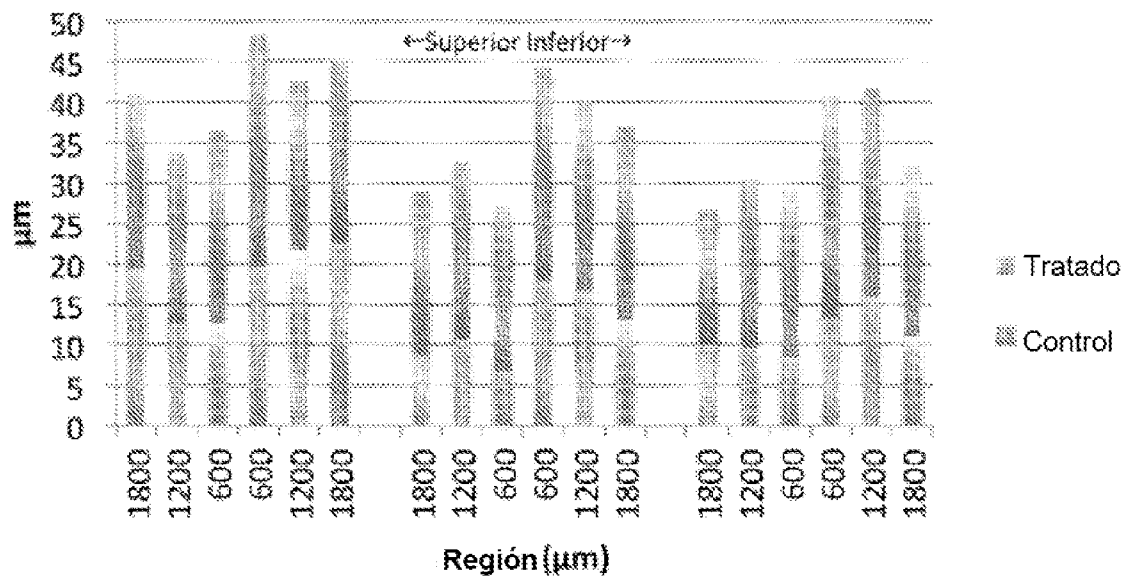


FIG. 3

### Grosor de ONL por ojo y región para 3 ratones



### Longitud de IS/OS por ojo y región para 3 ratones

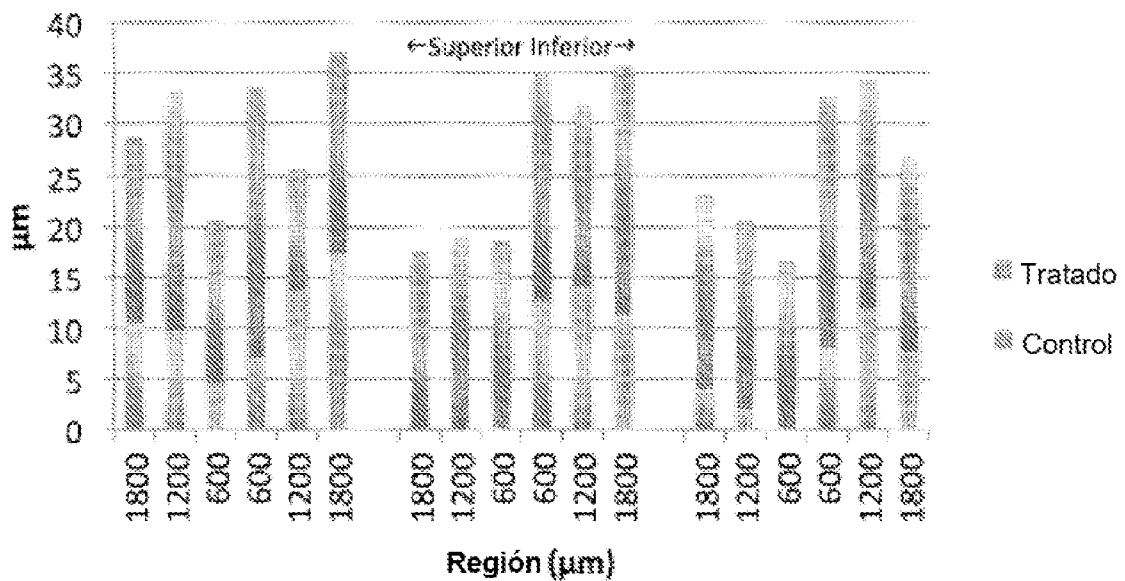


FIG. 4A

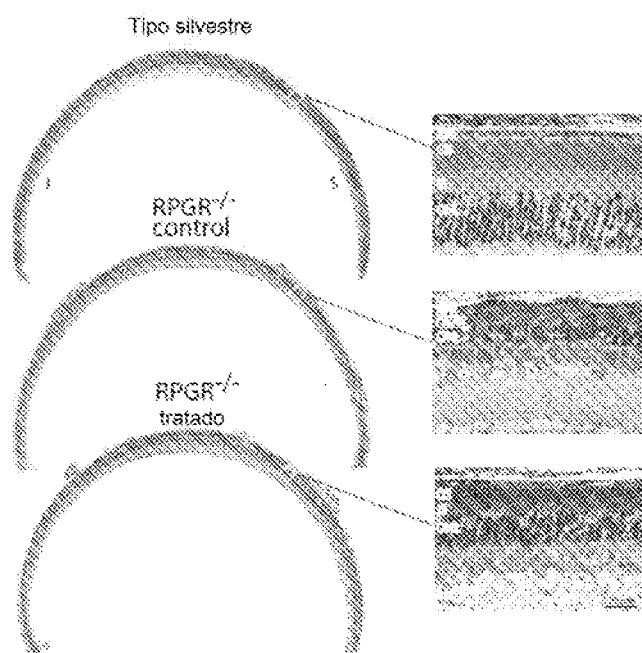


FIG. 4B

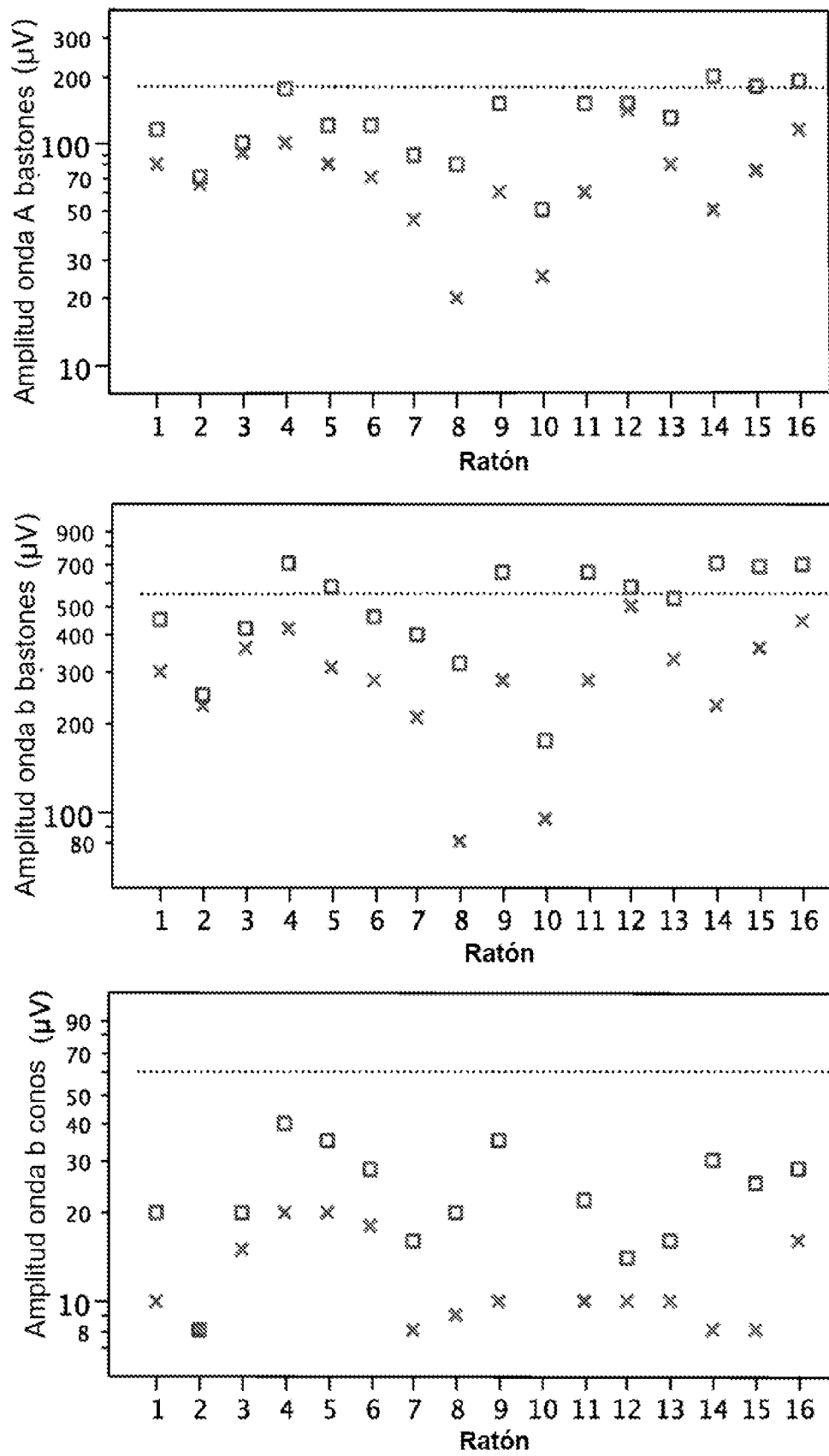


FIG. 5A

x OD    □ OS    ..... Limite inferior WT

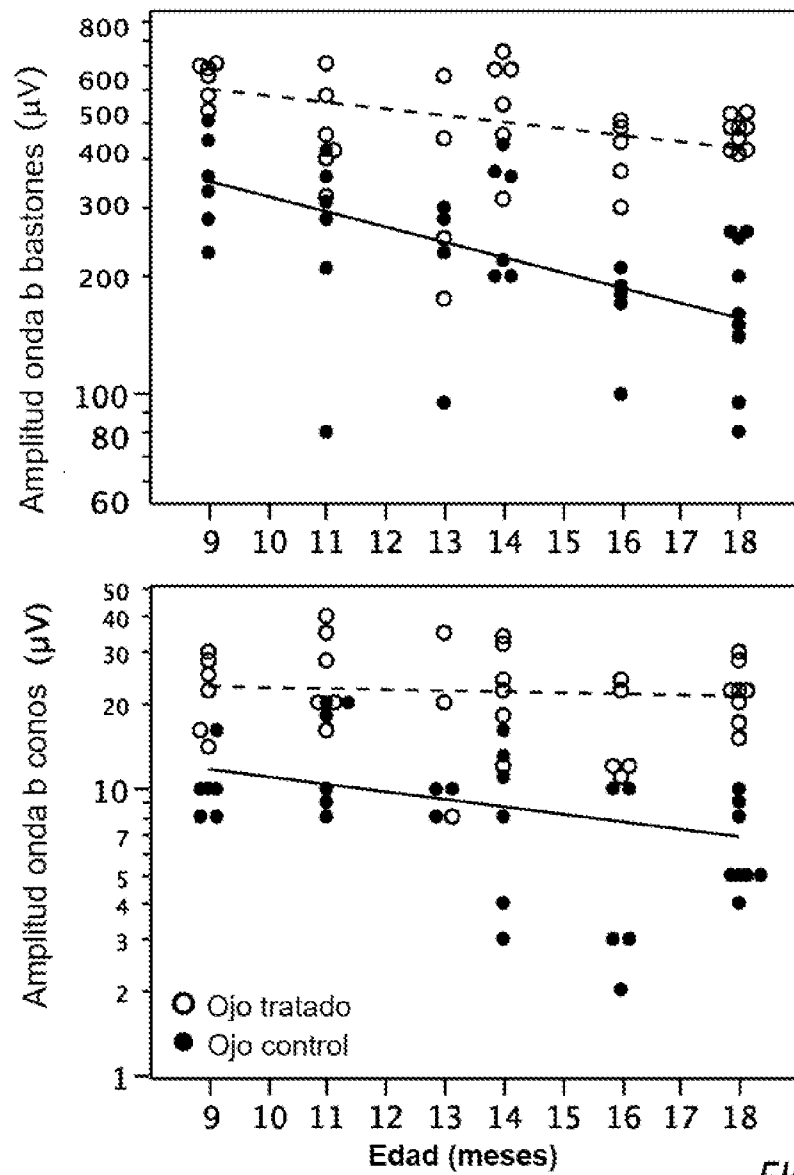


FIG. 5B

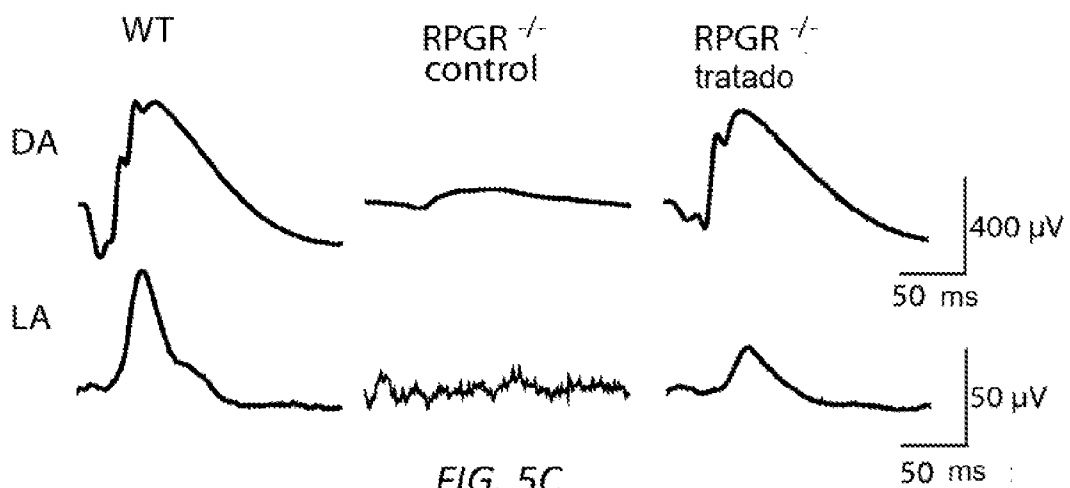


FIG. 5C

ERG de campo completo de pacientes con XLRP debida a mutaciones de RPGR

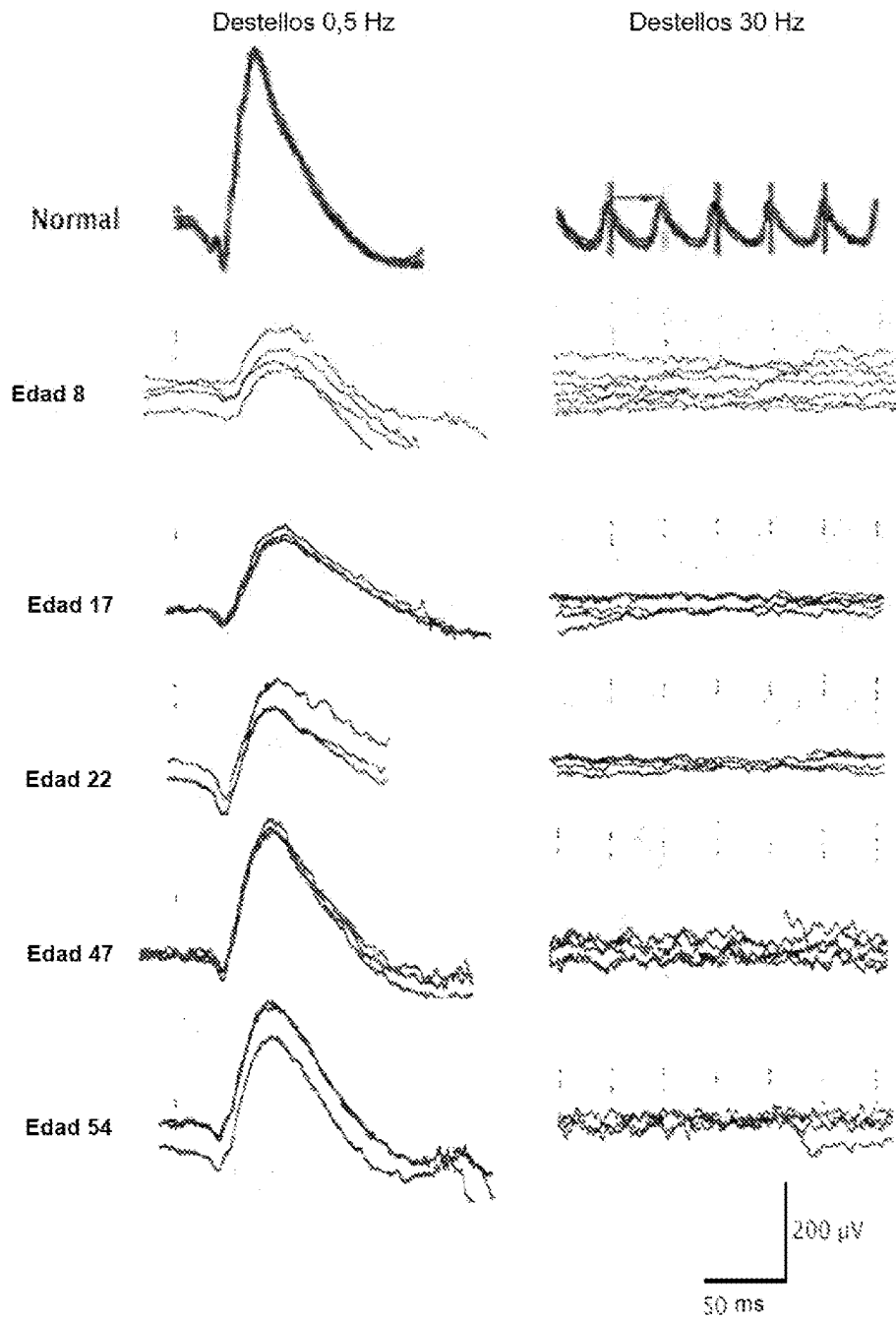


FIG. 6