

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 716 615**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2014 PCT/EP2014/063676**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14207190**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2014 E 14733199 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 3013946**

54 Título: **Métodos para expresar un polinucleótido de interés en la retina de un sujeto**

30 Prioridad:

28.06.2013 EP 13305914

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

13.06.2019

73 Titular/es:

**INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
SORBONNE UNIVERSITÉ (33.3%) y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)**

72 Inventor/es:

**DALKARA, DENIZ;
RENDON FUENTES, ALVARO;
SAHEL, JOSÉ ALAIN y
VACCA, OPHÉLIE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 716 615 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

Métodos para expresar un polinucleótido de interés en la retina de un sujeto

Campo

La presente divulgación se refiere a métodos para expresar un polinucleótido de interés en la retina de un sujeto.

5 Antecedentes

En los últimos años se han realizado grandes avances en las estrategias de terapia génica para el tratamiento de enfermedades de la retina, en particular en el uso de vectores de Virus Adeno-Asociados (AAV, de sus siglas en inglés). De hecho, los vectores AAV están actualmente entre los vectores virales más utilizados frecuentemente para la terapia génica dirigida a trastornos hereditarios y trastornos adquiridos de la retina, tal como la degeneración macular relacionada con la edad o la retinopatía diabética. Los AAV son considerados como el vector de elección para las terapias debido a su falta de patogenicidad, la expresión genética a largo plazo tras la inyección única, y la capacidad de infectar la mayoría de las células de la retina. El AAV es un virus compuesto de 4,7 kb de un genoma de ADN monocatenario encerrado dentro de una cápside de 25 nm. El tropismo celular y la eficacia de transducción de este virus depende de la composición de la cápside que permite la unión del receptor inicial, la entrada celular, los mecanismos de tráfico y que define la selectividad hacia tejidos y células específicos. La barrera sanguínea de la retina (BRB, de sus siglas en inglés) minimiza la diseminación sistémica del virus y la probabilidad de efectos adversos sistémicos no deseados tras la administración intraocular. Por otra parte, las repuestas inmunológicas después de la administración del vector intraocular se atenúan en comparación con aquellos tras administración sistémica. Un límite importante de tal terapia es que para la mayoría de los serotipos de AAV la administración intravítrea da como resultado una pobre transducción retinal, restringida a las células de la retina interna (principalmente las células ganglionares de la retina y algunas células de Müller). La retina externa (fotorreceptores y epitelio pigmentario de la retina) tiene la mayoría de las mutaciones que conducen a la degeneración de la retina. La única vía para obtener la administración génica mediada por AAV para estos tipos de células importantes terapéuticamente, ha sido el uso de la vía de inyección subretiniana. Sin embargo, la inyección subretiniana de AAV necesita realizar vitrectomía para crear un agujero de penetración de la aguja a través de la retina y separar con la inyección de fluido los fotorreceptores del apoyo del epitelio pigmentario de la retina (RPE, de sus siglas en inglés), causando daño tisular en el lugar de la inyección. Los tres ensayos clínicos recientes para la enfermedad retiniana de la amaurosis congénita de Leber de tipo 2 (LCA2, de sus siglas en inglés) emplea inyecciones subretinianas para administrar el AAV que lleva el gen RPE65 que codifica la isomerasa retiniana hacia el RPE; el protocolo del ensayo se ha beneficiado de la patología atípica del LCA2, que muestra una pérdida de la función de fotosensibilidad sin una alteración estructural significativa de las capas de la retina durante muchos años (Jacobson et al., 2005, Brainbridge et al., 2008, Cideciyan et al., 2008, Maguire et al., 2008, Maguire et al., 2009). Por el contrario, la mayoría de las enfermedades degenerativas de la retina (incluyendo la retinitis pigmentosa y la degeneración macular, que se consideran la mitad de los casos de degeneración de la retina) se caracterizan por la pérdida progresiva de las células fotorreceptoras y una arquitectura retiniana frágil cada vez mayor a través de toda la retina (Wright et al., 2010, Lin et al., 2009). En tales estados de enfermedad, la cirugía subretiniana puede inducir daño mecánico, gliosis reactiva, y pérdida de la función (Nork et al., 2012). Estos efectos de procedimiento se han documentado en un ensayo de la LCA2, como pacientes que reciben una inyección subretiniana bajo la región de la fovea con pérdida de espesor de la retina y de agudeza visual; estos resultados condujeron a los investigadores a concluir que la terapia génica del LCA es eficaz en la retina extra-fovea pero que no ofrece beneficios y ofrece algunos riesgos en el tratamiento de la fovea (Jacobson et al., 2012). La falta de infección desde el vítreo es debido a las bajas concentraciones locales debido a la difusión en el vítreo así como a las barreras físicas de penetración retiniana por las partículas virales. Se ha demostrado que los AAV inyectados en el vítreo se acumulan en el área de la membrana que limita el interior (ILM, de sus siglas en inglés) donde esta membrana está desorganizada o, difunde hacia fuera desde la retina y que la digestión media del ILM mejora la transducción de AAV (Dalkara et al. 2009). La ILM presenta una barrera para la penetración de AAV en la retina desde el vítreo en adultos pero esta es la mejor vía de administración de AAV. Desde el desarrollo de un modelo animal de ratón nulo en Dp71 (Publicación de Patente Internacional N^{os} WO 2010/149765) y la investigación del papel del inhibidor DP71 en enfermedades angiogénicas (Publicación de Patente Internacional N^{os} WO 2010/000851), es significativa la necesidad de establecer la mejor vía para la administración de AAV.

Compendio

La presente invención se refiere a un vector que contiene el polinucleótido de interés en combinación con una cantidad de un inhibidor de la expresión de Dp71 para usar en un método de tratamiento, o prevención, o inhibición de enfermedades de la retina para expresar un polinucleótido de interés en la retina de un sujeto, mediante inyección intravítrea, en donde el inhibidor de Dp71 se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ARN anti-sentido, moléculas de ADN anti-sentido, ARN bicatenario pequeño (ARNds) y ARNs inhibitorios pequeños (ARNsi). En particular, la presente invención se define mediante las reivindicaciones.

Descripción detallada

El propósito de los investigadores era investigar el tropismo y la eficacia de los AAVs en el modelo de ratón de Dp71 nulo que presenta barreras de la retina permeables, para elegir el mejor AAV para una futura terapia génica destinada a tratar enfermedades con tales síntomas de barreras permeables (tal como la barrera sanguínea de la retina) y para asegurar la seguridad de la infección del virus a través de la BRB permeable. Además, estudiaron las células de Müller en consideración de la barrera sanguínea de la retina (BRB) y la membrana limitante interna (ILM) del ratón con Dp71 nulo en comparación con ratones de tipo salvaje. Los investigadores se centraron en comprender a través de la infección con AAV cómo funcionaban estas células gliales cuando se comprometía la BRB. Para dirigirse a las células gliales y, de este modo, a la restauración de la barrera BRB, emplearon una variante de AAV, ShH10-GFP, modificado genéticamente para dirigirse específicamente a las células de Müller (Klimczak et al. 2009). Encontraron que las células de Müller se transducen más ampliamente en ratones con Dp71 nulo y cómo las interacciones gliales se alteran en los ratones con Dp71 nulo en la ILM. Esto conduce a informarse acerca de la integridad de esta barrera de la retina -la ILM- que tiene un impacto negativo en la transducción viral después de la administración intravítrea. Los inventores observaron que criosecciones de 20 nm y en OCT in vivo las imágenes de los ratones con Dp71 nulo de la retina interna es significativamente más delgada que la de los ratones de tipo salvaje, indicando una alteración de la retina interna en los ratones defectuosos. Para ensayar si la ILM en los ratones con Dp71 nulo está realmente desorganizada, inyectaron AAV5-GFP, un serotipo de AAV que no conduce a la transducción de las neuronas retinianas, mediante inyección intravítrea en ratones de tipo salvaje debido a la barrera ILM. Se demostró que los fotorreceptores en los ratones con Dp71 nulo se transducían en gran parte, probando que la ILM se altera en ratones genosuprimidos permitiendo la difusión de este virus a través de la retina. Finalmente, se plantearon la cuestión de la integridad de la BRB y revisaron si el AAV puede atravesar la BRB después de la inyección intravítrea de ShH10-GFP, su vector terapéutico potencial. Los inventores descubrieron que no se encontró rastro de este virus en el flujo sanguíneo de los ratones de tipo salvaje o en los ratones con el Dp71 nulo a las 24, 48 ó 72 horas después de la inyección intravítrea de ShH10. Demostraron que, en ratones con Dp71 nulo, la ILM es altamente permeable para serotipos AAV diferentes después de una inyección intravítrea, mientras que la BRB permanece selectiva para partículas tales como los AAVs.

La presente divulgación se refiere a un método para expresar un polinucleótido de interés en la retina de un sujeto que comprende la etapa que consiste en inyectar en el vítreo una cantidad de un vector que contiene el polinucleótido de interés en combinación con una cantidad de un inhibidor de la expresión de Dp71.

Según la presente invención, el término “sujeto” o “sujeto que necesita del mismo”, se destina a un ser humano o un mamífero no humano. Normalmente el sujeto está afectado o probablemente esté afectado por una enfermedad retiniana.

Como se emplea en la presente memoria, el término “enfermedad retiniana” se refiere a una amplia clase de enfermedades en donde está afectado el funcionamiento de la retina, por ejemplo, debido a un daño o degeneración de los fotorreceptores; el ganglio o nervio óptico; o incluso a neovascularización. Un experto en la técnica puede distinguir enfermedades retinianas hereditarias y enfermedades retinianas adquiridas. Ejemplos representativos de enfermedades retinianas adquiridas incluyen, pero no se limitan a, la degeneración macular, tal como la degeneración macular relacionada con la edad, y retinopatías diabéticas. Ejemplos de enfermedades retinianas hereditarias incluyen, pero no se limitan a, retinitis pigmentosa, Amaurosis congénita de Leber, retinosquiasis ligada al cromosoma X.

El método de la presente divulgación es particularmente relevante para expresar un polinucleótido de interés en la retina externa (fotorreceptores y epitelio pigmentario de la retina).

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos para tratar, prevenir, o, inhibir enfermedades retinianas, que comprenden la etapa general de inyectar en el vítreo del sujeto una cantidad de un vector que contiene el polinucleótido de interés en combinación con una cantidad de un inhibidor de la expresión de Dp71.

Por tanto, dadas las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria, se puede tratar una amplia variedad de enfermedades del ojo.

Por ejemplo, el método de la divulgación se realiza para tratar o prevenir la degeneración macular. En resumen, la principal causa de pérdida visual en los ancianos es la degeneración macular (MD, de sus siglas en inglés), que tiene un cada vez mayor impacto social y económico en los Estados Unidos. Como el tamaño de la población anciana incrementa en este país, la degeneración macular relacionada con la edad (AMD, de sus siglas en inglés) se volverá una de las causas de ceguera más prevalentes que la retinopatía diabética y el glaucoma en combinación. Aunque el tratamiento láser ha demostrado reducir el riesgo de cicatrización macular extensa a partir de la forma “húmeda” o neovascular de la enfermedad, actualmente hay tratamientos que no son eficaces para la gran mayoría de los pacientes con MD.

El método de la divulgación se puede realizar también para tratar o prevenir una degeneración retiniana hereditaria. Una de las degeneraciones de la retina hereditaria más comunes es la retinitis pigmentosa (RP), que da como resultado la degeneración de las células fotorreceptoras, y del RPE. Otras afecciones hereditarias incluyen el

síndrome de Bardet-Biedl (autosómica recesiva); síndrome de Bassen-Kornzweig, enfermedad de Best, atrofia girada, amaurosis congénita de Leber, síndrome de Refsum, enfermedad de Stargardt; distrofia de conos y bastones (formas dominantes autosómicas y formas ligadas al cromosoma X); ceguera nocturna estacionaria congénita (formas autosómica dominante, autosómica recesiva y ligadas al cromosoma X); degeneración macular (formas autosómica dominante y autosómica recesiva); atrofia óptica (formas autosómica dominante y formas ligadas al cromosoma X); retinitis pigmentosa (formas autosómica dominante, autosómica recesiva y ligadas al cromosoma X); retinopatía síndrómica o sistémica (formas autosómica dominante, autosómica recesiva y ligadas al cromosoma X); y síndrome de Usher (autosómica recesiva).

En el contexto de la divulgación, el término “tratar” o “tratamiento”, como se emplean en la presente memoria, significa revertir, aliviar, inhibir el progreso de, o prevenir el trastorno o afección a los que tales términos se aplican, o uno o más síntomas de tal trastorno o afección (es decir, enfermedades retinianas).

Un experto en la técnica conoce, mediante el conocimiento de la bibliografía científica en su campo, cuales son los polinucleótidos más apropiados para tratar una enfermedad retiniana específica.

Un producto de polinucleótido particular es un polipéptido que mejorará la función de la célula de la retina, por ejemplo, la función de una célula fotorreceptora de un batón o cono o, una célula ganglionar de la retina, una célula de Müller, una célula bipolar, una célula amacrina, una célula horizontal, o una célula del epitelio pigmentario de la retina. Ejemplos de polinucleótidos de interés incluyen, pero no se limitan a, los que codifican un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en polipéptidos neuroprotectores (por ejemplo, GDNF, CNTF, NT4, NGF, y NTN); polipéptidos anti-angiogénicos (por ejemplo, un factor de crecimiento endotelial vascular soluble (VEGF, de sus siglas en inglés); un anticuerpo de unión a VEGF; un fragmento del anticuerpo de unión a VEGF (por ejemplo, un anticuerpo de cadena única anti-VEGF); endostatina; tumstatina; angiostatina; un polipéptido Fit soluble (Lai et al. (2005) *Mol. Ther.* 12:659), una proteína de fusión que comprende un polipéptido Fit soluble (véase, por ejemplo, Pechan et al. (2009) *Gene Ther.* 16: 10); factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF); receptor Tie-2 soluble, etc.; inhibidor tisular de metaloproteinasas-3 (TIMP-3); opsina sensible a la luz, por ejemplo, una rodopsina; polipéptidos anti-apoptóticos (por ejemplo, Bcl-2, Bcl-X1); y similares. Otros polipéptidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF); factor de crecimiento de fibroblastos 2; neurturina (NTN); factor neurotrófico ciliar (CNTF); factor de crecimiento nervioso (NGF); neurotrofina-4 (NT4); factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF); factor de crecimiento epidérmico; rodopsina; inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X; y Sonic hedgehog. Opsinas sensibles a la luz adecuadas incluyen, por ejemplo, una opsina sensible a la luz como se describe en la Publicación de Patente U.S. N° 2007/0261127 (por ejemplo, ChR2; Chop2, CaTCh); la Publicación de Patente U.S. N° 2001/0086421; la Publicación de Patente U.S. N° 2010/0015095; y Diester et al. (2011) *Nat. Neurosci.* 14:387.14:387 o halorrodopsina (por ejemplo, eNpHR) u otro canal iónico de entrada de luz o bombas de protones. Polipéptidos adecuados incluyen también retinosquisina. Polipéptidos adecuados incluyen, por ejemplo, regulador GTPasa de la retinitis pigmentosa (RGPR) que interacciona con la proteína 1 (véase, por ejemplo, los N°s de Acceso Genbank Q96KN7, Q9EPQ2, y Q9GLM3); perifera-2 (Prph2) (véase, por ejemplo, el N° de Acceso Genbank NP_000313; perifera; una proteinisomerasa retiniana (RPE65), (véase, por ejemplo, AAC39660 de Genbank; y Morimura et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 95:3088) y similares. Polipéptidos adecuados incluyen también: CHM (coroideremia (Rab escort protein 1)), un polipéptido que, cuando falta o está defectuoso, causa coroideremia (véase, por ejemplo, Donnelly et al. (1994) *Hum. Mol. Genet.* 3: 1017; y van Bokhoven et al. (1994) *Hum. Mol. Genet.* 3: 1041); y Crumbs homolog 1 (CRB1), un polipéptido que, cuando falta o está defectuoso, causa la amaurosis congénita de Leber y retinitis pigmentosa (véase, por ejemplo, den Hollander et al. (1999) *Nat. Genet.* 23:217; y el N° de Acceso a GenBank CAM23328). Polipéptidos adecuados incluyen también polipéptidos que, cuando faltan o están defectuosos, conducen a acromatopsia, donde tales polipéptidos incluyen, por ejemplo, la subunidad alfa al canal de entrada de cGMP del fotorreceptor del cono (CNGA3) (véase, por ejemplo, el N° de Acceso al GenBank NP_001289; y Booij et al. (2011) *Ophthalmology* 118: 160-167); la subunidad beta al canal catiónico de entrada de cGMP del fotorreceptor del cono (CNGB3) (véase, por ejemplo, Kohl et al. (2005) *Eur J Hum Genet.* 13(3):302); la proteína que se une al nucleótido guanina (proteína G), polipéptido de actividad de transducción alfa 2 (GNAT2) (ACHM4); y ACHM5; y polipéptidos que, cuando faltan o están defectuosos, conducen a varias formas de ceguera del color (por ejemplo, L-opsina, M-opsina, y S-opsina). Véase Mancuso et al. (2009) *Nature* 461(7265):784-787. En una realización particular, el polinucleótido de interés puede codificar para un factor neurotrófico. Como se emplea en la presente memoria, el “factor neurotrófico” es un término genérico de proteínas que tienen una acción fisiológica, tal como la supervivencia y el mantenimiento de células nerviosas, promoción de la diferenciación neuronal. Ejemplos de factores neurotróficos incluyen, pero no se limitan a, bFGF, aFGF, BDNF, CNTF, IL-1beta, NT-3, IGF-II, GDNF, NGF y RdCVF.

En determinadas circunstancias, el producto polinucleótido de interés es una endonucleasa específica del sitio que proporciona una función genética genosuprimida específica del sitio, por ejemplo, cuando la endonucleasa genosuprime un alelo asociado a una enfermedad retiniana. Por ejemplo, cuando un alelo dominante codifica una copia defectuosa de un gen que, cuando es de tipo salvaje, es una proteína estructural retiniana y/o proporciona una función retiniana normal, una endonucleasa específica del sitio (tal como TALE-nucleasas, meganucleasas o nucleasas con dedos de Zinc) se pueden dirigir al alelo defectuoso y genosuprimir el alelo defectuoso. Además de genosuprimir un alelo defectuoso, una nucleasa específica del sitio se puede utilizar también para estimular la recombinación homóloga con un ADN donante que codifica una copia funcional de la proteína codificada por el alelo defectuoso. Por tanto, por ejemplo, el método de la divulgación se puede emplear para administrar una

endonucleasa específica del sitio que genosuprime un alelo defectuoso, y se puede emplear para administrar una copia funcional del alelo defectuoso, dando como resultado una reparación del alelo defectuoso, proporcionando, de este modo la producción de una proteína de la retina funcional (por ejemplo, retinosquisina funcional, RPE65 funcional, periferina funcional, etc). Véase, por ejemplo, Li et al. (2011) Nature 475:217. En algunas realizaciones, el vector comprende un polinucleótido que codifica una endonucleasa específica del sitio; y un polinucleótido que codifica una copia funcional de un alelo defectuoso, donde la copia funcional codifica una proteína funcional de la retina. Proteínas funcionales de la retina incluyen, por ejemplo, retinosquisina, RPE65, regulador GTPasa de la retinitis pigmentosa (RGPR) que interacciona con la proteína 1, periferina, periferina-2, y similares. Las endonucleasas específicas del sitio que son adecuadas para usar incluyen, por ejemplo, nucleasas con dedos de zinc (ZFNs); y nucleasas efectoras similares a las del activador de transcripción (TALENs), donde tales endonucleasas específicas del sitio no aparecen de manera natural y se modifican para dirigirse a un gen específico. Tales nucleasas específicas del sitio se pueden modificar por ingeniería genética para cortar localizaciones específicas dentro de un genoma, y después se puede reparar la ruptura de la unión de un extremo no homólogo mientras que se insertan o suprimen varios nucleótidos. Tales endonucleasas específicas del sitio (también referidas como "INDELS") empujan a la proteína fuera del marco y genosuprimen de manera eficaz el gen. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente U.S. N° 2011/0301073.

En algunas realizaciones, el producto polinucleótido es un ARN de interferencia (ARNi). Normalmente, el ARNi adecuado incluye un ARNi que disminuye el nivel de un factor apoptótico o angiogénico en una célula. Por ejemplo, un ARNi puede ser un ARN de horquilla corta (ShRNA) o ARNs que reduce el nivel de un producto polinucleótido que induce o promueve la apoptosis en una célula. Los genes cuyos productos polinucleótidos inducen o promueven la apoptosis se refieren en la presente memoria como "genes pro-apoptóticos" y los productos de estos genes (ARNm; proteína) se refieren como "productos polinucleótidos pro-apoptóticos". Los productos polinucleótidos pro-apoptóticos incluyen, por ejemplo, los productos polinucleótidos Bax, Bid, Bak, y Bad. Véase, por ejemplo, la Patente U.S. N° 7.846.730. Los ARNs de interferencia podrían también ser contrarios a un producto angiogénico, por ejemplo, VEGF (por ejemplo, Cand5; véase, por ejemplo, la Publicación de Patente U.S. N° 2011/0143400; la Publicación de Patente U.S. N° 2008/0188437; y Reich et al. (2003) Mol. Vis. 9:210), VEGFR1 (véase, Sirna-027; véase, por ejemplo, Kaiser et al. (2010) Am. J. Ophthalmol. 150:33; y Shen et al. (2006) Gene Ther. 13:225), o VEGFR2 (Kou et al. (2005) Biochem. 44: 15064). Véanse también, las Patentes U.S. N°s 6.649.596, 6.399.586, 5.661.135, 5.639.872, y 5.639.736; y las Patentes U.S. N°s 7.947.659 y 7.919.473.

En una realización, el vector que contiene el polinucleótido de interés se selecciona del grupo que consiste en vectores de administración génica viral. Los vectores de administración génica viral incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico a partir de los siguientes virus: virus de ARN, tales como retrovirus (como por ejemplo el virus de la leucemia murina de Moloney y vectores derivados lentivirales), virus del sarcoma murino de Harvey, virus de tumores mamarios murinos, y virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adeno-asociados; virus del tipo SV40; virus de polio; virus de Epstein-Barr; virus de papiloma; virus del herpes; virus de vaccinia; virus de la polio y vectores AAV. El vector de administración génica viral preferido son los vectores rAAV. "AAV" es la abreviatura para los virus adeno-asociados, y se pueden emplear para referirse a virus en sí mismos o a derivados de los mismos. El término cubre a todos los serotipos y variantes tanto de las formas que aparecen de manera natural como las modificadas genéticamente. La abreviatura "rAAV" se refiere a virus adeno-asociados recombinantes, también referidos como un vector AAV recombinante (o vector "rAAV"). El término "AAV" incluye pero no se limita al AAV tipo 1 (AAV-1), AAV tipo 2 (AAV-2), AAV tipo 3 (AAV-3), AAV tipo 4 (AAV-4), AAV tipo 5 (AAV-5), AAV tipo 6 (AAV-6), AAV tipo 7 (AAV-7), AAV tipo 8 (AAV-8), y AAV tipo 9 (AAV9). Las secuencias genómicas de los distintos serotipos de AAV, así como las secuencias de las repeticiones terminales nativas (TRs), proteínas Rep, y subunidades de la cápside, son conocidas en la técnica. Tales secuencias se pueden encontrar en la bibliografía o en las bases de datos públicas, tales como en el GenBank. Véase, por ejemplo, los N°s de acceso NC_002077 (AAV-1), AF063497 (AAV-1), NC_001401 (AAV-2), AF043303 (AAV-2), NC_001729 (AAV-3), NC_001829 (AAV-4), U89790 (AAV-4), NC_006152 (AAV-5), AF513851 (AAV-7), AF513852 (AAV-8), y NC_006261 (AAV-8). Un "vector rAAV" como se emplea en la presente memoria se refiere a un vector AAV que comprende el polinucleótido de interés (es decir, un polinucleótido heterólogo) para la transformación genética de una célula. En general, los vectores rAAV contienen repeticiones terminales invertidas (ITRs) de virus 5' y 3' adeno-asociados, y el polinucleótido de interés unido operativamente a las secuencias que regulan su expresión en una célula diana.

En algunas realizaciones, el vector es un vector AAV pseudotipado. La frase "vector AAV pseudotipado", se designa en la presente memoria a una partícula de vector viral que comprende una cápside AAV nativa que incluye un genoma del vector rAAV y proteínas Rep AAV, en donde Cap, Rep y las ITRs del genoma del vector provienen de al menos 2 serotipos de AAV diferentes. Ejemplos de vectores quiméricos AAV incluyen, pero no se limitan a, AAV2/5, AAV2/6, y AAV2/8. En algunas realizaciones, el vector quimérico AAV es el AAV2/8 descrito en la Patente US N° 7.282.199.

En algunas realizaciones, el vector es un vector AAV modificado genéticamente. En particular, el vector AAV modificado genéticamente es el vector SH10 como se describe en Klimczak RR, Koerber JT, Dalkara D, Flannery JG, Schaffer DV. 2009. Una nueva variante viral adeno-asociada para la transducción intravítrea eficaz y selectiva de células Muller de rata. PLoS One 4(10):e7467. La variante ShH10 AAV está estrechamente relacionada con el serotipo AAV 6 (AAV6). En algunas realizaciones, el vector AAV modificado genéticamente tiene una cápside mutada, en particular una cápside mutada de tirosina. En algunas realizaciones, el vector AAV modificado

genéticamente es el descrito en WO2012145601. En algunas realizaciones, el vector es un virión del virus adeno-asociado recombinante (rAAV) que comprende una variante de la proteína de la cápside de AAV, en donde la proteína de la cápside de la variante AAV comprende una inserción de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos en el bucle GH de la proteína de la cápside relativa a la proteína de la cápside AAV parenteral correspondiente, y en donde la variante de la proteína de la cápside confiere un incremento ineficaz de una célula de la retina en comparación con la ineficacia de la célula de la retina por un virión AAV que comprende la proteína de la cápside AAV parental correspondiente. En algunas realizaciones, el vector es el AAV2-7m8 como se describe en WO2012145601 y Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, Visel M, Yin L, Merigan WH, Flannery JG, Schaffer DV. En la evolución dirigida in vivo de un nuevo virus adeno-asociado para la administración genética terapéutica de la retina externa desde el vítreo. *Sci Transl Med.* 2013 Jun 12;5(189):189ra76. Otros ejemplos incluyen aquellos descritos en:

- Kay CN, Ryals RC, Aslanidi GV, Min SH, Ruan Q, Sun J, Dyka FM, Kasuga D, Ayala AE, Van Vliet K, Agbandje-McKenna M, Hauswirth WW, Boye SL, Boye SE. Targeting photoreceptors via intravitreal delivery using novel, capsid-mutated AAV vectors. *PLoS One.* 2013. Abril 26;8(4):e62097. doi: 10.1371/journal.pone.0062097.
- Dalkara D, Byrne LC, Lee T, Hoffmann, Schaffer DV, Flannery JG. Enhanced gene delivery to the neonatal retina through systemic administration of tyrosine-mutated AAV9. *Gene Ther.* 2012 Feb;19(2):176-81. doi: 10.1038/gt.2011.163. Epub 2011 Oct 20.
- Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Min SH, Chiodo V, Pang JJ, Zhong L, Zolotukhin S, Srivastava A, Lewin AS, Hauswirth WW. High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. *Mol Ther.* 2009 Mar;17(3):463-71.
- Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Deng WT, Pang JJ, Min SH, Chiodo V, Neeley AW, Govindasamy L, Bennett A, Agbandje-McKenna M, Zhong L, Li B, Jayandharan GR, Srivastava A, Lewin AS, Hauswirth WW. Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. *Mol Ther.* 2011 Feb;19(2):293-301. doi: 10.1038/mt.2010.234. Epub 2010 Nov 2.

El vector puede comprender también secuencias reguladoras que permiten la expresión y, secreción de la proteína codificada, tal como, por ejemplo, un promotor, potenciador, señal de poliadenilación, sitios de entrada al ribosoma interno (IRES), secuencias que codifican dominios de transducción de proteína que codifican secuencias (PTD), y similares. A este respecto, el vector comprende una región promotora, unida operativamente al polinucleótido de interés, para causar o mejorar la expresión de la proteína en células infectadas. Tal promotor puede ser generalizado, específico del sitio, fuerte, débil, regulado, quimérico, inducible, etc., para permitir la producción eficaz y adecuada de la proteína en el tejido infectado. El promotor puede ser homólogo para la proteína codificada, o heterólogo, incluyendo promotores celulares, virales, fúngicos, vegetales o sintéticos. Los promotores preferidos para emplear en la presente divulgación deben ser funcionales en las células o la retina, más preferiblemente en los fotorreceptores o en las células ganglionares de la retina o en las células del RPE. Ejemplos de tales promotores regulados incluyen, sin limitación, promotores que contienen el elemento Tet on/off, promotores inducibles de rapamicina y promotores de metalotioneína. Ejemplos de promotores generalizados incluyen a promotores virales, particularmente los promotores CMV, el promotor RSV, el promotor SV40, etc. y promotores tales como el promotor PGK (fosfoglicerato quinasa). Los promotores pueden ser también promotores neuroespecíficos, tales como promotores de Sinapsina o el NSE (Enolasa Específica Neuronal) o secuencias promotoras (o NRSE (Elemento silenciador restrictivo Neuronal) localizadas corriente arriba a partir del promotor PGK generalizado), o promotores específicos para varios tipos de células de la retina, tales como el RPE65, el VMD2, promotores de rodopsina o de arrestina de conos. El vector puede comprender también secuencias dianas para miARNs que consiguen la supresión de la expresión transgénica en células no deseadas. Por ejemplo, la supresión de la expresión en líneas celulares hematopoyéticas (“de-direccionamiento”) permite la transferencia genética estable en las células transducidas mediante reducción de la incidencia y la extensión de la respuesta inmunológica específica del transgen (Brown BD, *Nature Medicine* 2008). En una realización particular, el vector comprende una secuencia líder que permite la secreción de la proteína codificada. La fusión del polinucleótido de interés con una secuencia que codifica un péptido de señal de secreción (normalmente localizado en el extremo N-terminal de los polipéptidos secretados) permitirá la producción de la proteína terapéutica en una forma que se puede secretar a partir de las células transducidas. Ejemplos de tales péptidos señal incluyen la albúmina, la β -glucuronidasa, la proteasa alcalina o los péptidos señal secretores de fibronectina. En una realización preferida, el promotor es específico o funcional en células de la retina, en particular en fotorreceptores o células ganglionares de la retina o en el RPE, es decir, permiten la expresión (preferencial) del transgen en dichas células. Por ejemplo, elementos reguladores específicos del fotorreceptor adecuados incluyen, por ejemplo, un promotor de de rodopsina; un promotor de quinasa de rodopsina (Young et al. (2003) *Ophthalmol. Vis. Sci.* 44:4076), un promotor genético beta fosfodiesterasa (Nicoud et al. (2007) *J. Gene Med.* 9:1015); un promotor del gen de retinitis pigmentosa (Nicoud et al. (2007) anteriormente citado); un potenciador genético de la proteína de unión al retinoide interfotorreceptor (IRBP) (Nicoud et al. (2007) citado anteriormente); un promotor genético de IRBP (Yokoyama et al. (1992) *Exp Eye Res.* 55:225).

Las dosis de los vectores se pueden adaptar fácilmente por el experto en la técnica, por ejemplo, dependiendo del estado de la enfermedad, del sujeto (por ejemplo, según su peso, metabolismo, etc.), del programa del tratamiento,

etc. Una dosis eficaz preferida dentro del contexto de esta divulgación es una dosis que permite una transducción óptima de las células de la retina (fotorreceptor o células ganglionares o células del RPE). Normalmente, se administran de 10^8 a 10^{12} genomas virales (unidades de transducción) por dosis en ratones, preferiblemente de aproximadamente 10^9 a 10^{11} . Normalmente, las dosis de los vectores AAV a administrar en seres humanos pueden oscilar de 10^8 a 10^{12} genomas virales, lo más preferiblemente de 10^9 a 10^{11} .

El término "Dp71" tiene su significado general en la técnica y se refiere al producto genético 71 de la Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). La proteína Dp71 consiste en un único extremo N-terminal de siete restos unido a los dominios C-terminales y ricos en cisteína de la distrofina (Hugnot, J.P., (1992) Lederfein, D., (1992)). En la tabla 1 se representan ejemplos de aminoácidos y secuencias de nucleótidos Dp71 nativos:

Isoforma	Número de Acceso al Genbank	Acceso base de datos GenPept
Variante del transcrito Dp71ab, ARNm	NM_004018	NP_004009
Variante del transcrito Dp71a, ARNm	NM_004017	NP_004008
Variante del transcrito Dp71b, ARNm	NM_004016	NP_004007
Variante del transcrito Dp71, ARNm	NM_004015	NP_004006

Tabla 1: isoformas de las variantes del transcrito Dp71

Un "inhibidor de la expresión de Dp71" se refiere a un compuesto natural o sintético que tienen un efecto biológico para inhibir o reducir significativamente la expresión de Dp71.

El inhibidor de la expresión de Dp71 puede consistir en una molécula orgánica pequeña que inhibe la expresión de Dp71. En particular, los inhibidores de Dp71 pueden consistir en beta-naftoflavona como se describe en Bermúdez de León et al. (2006).

Los inhibidores de la expresión para usar en la presente divulgación se pueden basar también en constructos de oligonucleótidos anti-sentido. Oligonucleótidos anti-sentido, que incluyen moléculas de ARN anti-sentido y moléculas de ADN anti-sentido, podrían actuar bloqueando directamente la traducción del ARNm Dp71 mediante la unión a ellas y previniendo o incrementando, por tanto, la traducción proteica o la degradación de ARNm disminuyendo, por tanto, el nivel de Dp71, y por tanto, la actividad, en una célula. Por ejemplo, se pueden sintetizar oligonucleótidos antisentido de al menos 15 bases y complementarias a regiones únicas a la secuencia del transcrito de ARNm que codifica el Dp71, por ejemplo, mediante técnicas fosfodiéster convencionales. Los métodos para usar en las técnicas antisentido para inhibir la expresión genética de genes cuya secuencia es conocida, son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véanse las Patentes U.S. N^{os} 6.566.135; 6.566.131; 6.365.354; 6.410.323; 6.107.091; 6.046.321, y 5.981.732). Los ARNs pequeños de interferencia (siARNs) pueden funcionar también como inhibidores de la expresión para usar en la presente divulgación. La expresión genética de Dp71 se puede reducir mediante la puesta en contacto de un sujeto o célula con un ARN bicatenario pequeño (ARNds), o un vector o constructo que causa la producción de un ARN bicatenario doble, tal que la expresión genética de Dp71 se inhibe específicamente (es decir, ARN de interferencia o ARNi). Los métodos para seleccionar ARNs o vectores que codifican ARNs adecuados son bien conocidos en la técnica para los genes cuya secuencia se conoce (Por ejemplo, véase, Tuschl. T. et al (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, G.J. (2002); McManus. et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); las Patentes U.S. N^{os} 6.573.099 y 6.506.559; y la Publicación de Patente Internacional N^{os} WO 01/36646, WO 99/32619, y WO 01/68836). Todos o una parte de los enlaces fosfodiéster de los ARNs de la divulgación se protegen de manera ventajosa. Esta protección se implementa generalmente a través de una vía química que emplea métodos que son bien conocidos en la técnica. Los enlaces fosfodiéster se pueden proteger, por ejemplo, mediante un grupo funcional tiol o amino o mediante un grupo fenilo. Los extremos 5' y/o 3' de los siARNs de la divulgación se pueden proteger de manera ventajosa, por ejemplo, empleando la técnica descrita anteriormente para proteger los enlaces fosfodiéster. Las secuencias ARNs comprenden de manera ventajosa al menos doce dinucleótidos contiguos o sus derivados. Como se emplea en la presente memoria, el término "derivados ARNs" con respecto a las secuencias de ácido nucleico presentes se refiere a un ácido nucleico que tiene un porcentaje de identidad de al menos el 90% con eritropoyetina o un fragmento de la misma, preferiblemente de al menos 95%, como en un ejemplo de al menos 98%, y más preferiblemente de al menos 98%. Como se emplea en la presente memoria, "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácido nucleico, significa el porcentaje de identidad del ácido nucleico, entre las dos secuencias a comparar, obtenido con la mejor alineación de dichas secuencias, siendo este porcentaje puramente estadístico, y siendo las diferencias entre estas dos secuencias distribuidas de manera aleatoria por las secuencias de ácido nucleico. Como se emplea en la presente memoria, la "mejor alineación" o "alineación óptima", significa la alineación para la que se determina el máximo porcentaje de identidad (véase más abajo). La comparación de secuencias entre dos secuencias de ácidos nucleicos se realiza normalmente mediante

comparación de estas secuencias que se han alineado previamente según la mejor alineación; esta comparación se realiza sobre los segmentos de comparación para identificar y comparar las regiones locales de similitud. Se puede producir la mejor alineación de secuencia para realizar la comparación, junto a una forma manual, mediante el empleo de un algoritmo de homología global desarrollado por SMITH y WATERMAN (*Ad. App. Math.*, vol.2, p:482, 1981), mediante el empleo de un algoritmo de homología local desarrollado por NEDDLEMAN y WUNSCH (*J. Mol. Biol.*, vol.48, p:443, 1970), mediante el empleo del método de las similitudes desarrollado por PEARSON y LIPMAN (*Proc. Natl. Acd. Sci. EE.UU.*, vol.85, p:2444, 1988), mediante el empleo de programas informáticos que emplean tales algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA en el Paquete de programas informáticos Genetics de Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI EE.UU.), mediante el empleo de algoritmos de alineación múltiples MUSCLE (Edgar, Robert, C., *Nucleic Acids Research*, vol. 32, p:1792, 2004). Para conseguir la mejor alineación local, se puede emplear preferiblemente el programa informático BLAST. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos se determina mediante comparación de estas dos secuencias alineadas de manera óptima, siendo las secuencias de ácido nucleico capaces de comprender adiciones o deleciones con respecto a la secuencia de referencia para obtener la alineación óptima entre estas dos secuencias. El porcentaje de identidad se calcula mediante la determinación del número de posiciones idénticas entre estas dos secuencias, y dividiendo este número por el número total de posiciones comparadas, y multiplicando el resultado obtenido entre 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Una característica esencial de la divulgación es que el oligonucleótido antisentido no se administra junto con un vector viral. Por consiguiente, el oligonucleótido antisentido se inyecta en solitario (es decir "desnudo") en el vítreo del paciente y, por tanto, se excluye del alcance de la invención el empleo de vectores virales codificantes para la expresión de Dp71. Un experto en la técnica conoce los oligonucleótidos que se emplean normalmente en las clínicas para inyecciones intravítreas (por ejemplo, en pacientes inmunosuprimidos frente a infecciones de la retina por citomegalovirus con Vitravene®, administración en la retina mediante inyecciones intravítreas repetidas).

En algunas realizaciones, el vector que contiene el polinucleótido de interés y el inhibidor de la expresión de Dp71, se puede emplear simultánea o secuencialmente dentro de un tiempo dado. El inhibidor de la expresión de Dp71 se puede inyectar en el vítreo en cualquier orden, por ejemplo, el inhibidor de la expresión Dp71 se puede inyectar primero en el vítreo y el vector que contiene el polinucleótido de interés se puede inyectar después, o viceversa.

La presente divulgación proporciona también una composición farmacéutica que comprende un vector que contiene el polinucleótido de interés, un inhibidor de la expresión Dp71 y un vehículo, diluyente, excipiente, o tampón aceptable farmacéuticamente. Según la divulgación, la composición farmacéutica es compatible para la inyección intravítrea. En algunas realizaciones, el vehículo, diluyente, excipiente, o tampón aceptable farmacéuticamente, es adecuado para usar en un ser humano. Tales excipientes, vehículos, diluyentes y tampones incluyen a cualquier agente farmacéutico que se pueda administrar sin excesiva toxicidad. Los vehículos podrían incluir como vectores sintéticos lípidos catiónicos, lípidos no iónicos y polietilenglicol (PEG), para mejorar la administración de ARNsi. El ARNsi se podría contener en el interior hidrofílico de la partícula o se pueden usar polietileneimina y derivados para fabricar tanto agentes de administración polimérica lineal como ramificada. Los polímeros catiónicos con una estructura lineal o ramificada pueden servir como agentes de transfección eficaces debido a su capacidad para unir y condensar ácidos nucleicos dentro de nanopartículas estabilizadas. Tales materiales han demostrado también estimular la endocitosis no específica, así como el escape endosomal necesario para mejorar la reabsorción de ácido nucleico. Los agentes de administración basados en ciclodextrina se pueden emplear también para incrementar la administración de ARNsi. Excipientes aceptables farmacéuticamente incluyen, pero no se limitan a, líquidos tales como agua, suero salino, glicerol y etanol. Se pueden incluir allí dentro sales aceptables farmacéuticamente, por ejemplo, sales de ácido mineral, tal como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. Adicionalmente, en tales vehículos se pueden presentar sustancias auxiliares, tal como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias reguladoras del pH, y similares. En la técnica se conoce una amplia variedad de excipientes aceptables farmacéuticamente y no es necesario que se discuta en detalle en la presente memoria. Excipientes aceptables farmacéuticamente se describen ampliamente en una variedad de publicaciones, que incluyen, por ejemplo, A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20ª edición, Lippincott, Williams y Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel et al., eds, 7ª ed., Lippincott, Williams y Wilkins; y Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A.H. Kibbe et al., eds., 3ª ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

La invención se ilustrará además mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no se deberán interpretar de ningún modo como limitantes del alcance de la presente invención.

55 Ejemplos

Ejemplo: Administración genética mediada por AAV en enfermedades de la retina con barreras comprometidas.

Material y métodos

Animales

Los ratones de Dp71 nulo (Sarig et al 1999) fueron ofrecidos amablemente por el Dr David Yaffe y se produjeron mediante reemplazamiento, a través de recombinación homóloga, la mayor parte del primer y único exón del Dp71 y el primer intrón de la parte pequeña de Dp71 con una secuencia que codifica una proteína quimérica (β -geo) de resistencia a β -gal-neomicina. En esta línea de ratones, la expresión de Dp71 se suprimió sin interferir con la expresión de otros productos de los genes de la DMD (Distrofia Muscular de Duchenne). Se utilizó la cepa de ratones C57BL/6J (JANVIER, Francia) como controles para este estudio. Todos los animales empleados en este estudio se atendieron para la manipulación según el Informe ARVO para el Uso de los Animales en la Investigación de la Visión y Oftalmología.

Generación y purificación de vectores AAV

Los AAVs recombinantes se produjeron mediante el método de co-transfección plasmídica (Choi et al. 2007a; Choi et al. 2007b), y los lisados resultantes se purificaron a través de ultracentrifugación de gradiente de yodixanol como se describió anteriormente. Se concentró brevemente una fracción de yodixanol al 40% y el tampón se reemplazó empleando Unidades de Filtro Centrífugo Amicon Ultra-15. Las existencias de los vectores se titularon después para los genomas del vector de resistencia ADNasa mediante PCR en tiempo real para un estándar (Aurnhammer et al. 2012).

Inyecciones

Antes de la administración del vector, los ratones se anestesiaron con ketamina (50 mg/kg) xilacina (10 mg/kg Rompum). Las pupilas se dilataron mediante instilación ocular de neosinefrina 5% Faure (Europhtha) y gotas oculares midriaticum 0,5% (Théa). Se pasó a través de la esclerótica una aguja desechable ultrafina de calibre 30, hasta el ecuador y próximo al limbo, en la cavidad vítrea. Se realizó con observación directa de la aguja en el centro de la cavidad vítrea, una inyección de 1 μ l que contienen $1-4 \times 10^{11}$ vp. Se inyectaron los ojos izquierdos y los ojos derechos sirvieron como control.

Fotografía del fondo

Los exámenes del fondo se realizaron a los 7, 14, 21 y 28 días después de la inyección intravítrea de AAV5 o ShH10 que codifica GFP bajo el promotor CAG generalizado. Se obtuvieron fotografías de fondo con un oftalmoscopio de escaneo láser (SLO, de sus siglas en inglés) (HRA, Heidelberg, Alemania) o con una cámara de fondo Micron III. Las pupilas de los ratones se dilataron mediante la aplicación de neosinefrina (5%) y gotas oculares midriaticum (0,5%) antes de la toma de imágenes.

Tomografía de coherencia óptica

La OCT se realizó mediante el sistema SD-OCT (Bioptigen Inc., Durham, NC). Se utilizó hidratación con suero salino normal para conservar la claridad corneal. El análisis del volumen centrado en la cabeza del nervio óptico se realizó empleando 100 líneas de escaneo B horizontales, rasterizadas y consecutivas, cada una compuesta por 1200 escaneos A. El tamaño del volumen fue de 1,4 x 0,1 mm a cada lado del nervio óptico. Se empleó un programa informático personalizado para generar la imagen de la cara del fondo empleando la información de reflectancia obtenidas a partir de las secciones OCT (proyección de la magnitud del volumen), para que fuera posible y preciso la correlación punto a punto entre la OCT y la posición del fondo.

Análisis PCR de muestras de sangre de ratón

Se extrajo el ADN genómico partir de muestras sanguíneas empleando un Micro Kit de ADN QIAamp® (QIAGEN, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones PCR del ADN genómico se realizaron empleando la ADN polimerasa GoTaq® (Promega, EE.UU.) en un aparato termociclador (Applied Biosystems). Los cebadores PCR se diseñaron empleando el programa informático Primer3.

Inmunoquímica

Un mes después de la inyección del vector, se diseccionaron los ojos enucleados para extraer las lentes y la córnea, y se fijaron mediante inmersión en paraformaldehído 4% durante 1 hora. Los ojos fijados se crioprotegieron en sacarosa al 30%, se congelaron y se embebieron en Cryomatrix (Thermo Shandon). Se cortaron microsecciones de 10 μ m y se colocaron en portaobjetos SuperFrost/Plus (Microm). Las secciones se permeabilizaron durante 10 minutos con Triton X100 0,1% en PBS (tampón fosfato salino) y se bloqueó durante 1 hora con albúmina de suero bovino 1%, Tween 20 0,1% en PBS. Para los soportes de la retina, los ojos enucleados se sumergieron fijados en paraformaldehído 4% durante 10 minutos. Las retinas se separaron de la esclerótica y del RPE cortando alrededor de la ora serrata y cortando el nervio óptico. Para las secciones de agarosa, las retinas fijadas se lavaron con PBS, se embebieron en agarosa caliente 5% (tipo XI, Sigma) y se realizaron secciones de 100 μ m con un vibratomo (Leica, Allendale, NJ). Las secciones se incubaron después con anticuerpos primarios diluidos a 1:500 a 4°C durante la noche. Después de varios lavados con PBS, los anticuerpos secundarios (Interchim, Francia) acoplados a Alexa fluor (Invitrogen, Francia) se emplearon diluidos a 1:800 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las retinas se montaron con el reactivo Fluorsave (Calbiochem). Se realizó la microscopía confocal en un microscopio confocal de escaneo láser Olympus FV1000. Las imágenes se adquirieron de manera secuencial, línea por línea, para reducir la

excitación y la emisión de interferencias, el tamaño de la etapa se definió según el teorema de muestreo de Nyquist-Shannon. Se emplearon las configuraciones de exposición que minimizaron los píxeles sobresaturados en las imágenes finales. Después se procesaron imágenes de doce bits con FIJI, se proyectaron secciones Z sobre un plano único empleando una intensidad máxima bajo la función de proyección Z y finalmente se convirtió al RGB de 8 bits en el modo en color.

Análisis de datos

Los resultados se expresaron como la media \pm Error Estándar de la Media (SEM, de sus siglas en inglés). Se tomaron un montón de imágenes confocales de 50 imágenes con la misma configuración. Estas imágenes se Z-proyectaron y se cuantificó el área de fluorescencia con el programa informático Fiji (Fiji Is Just ImageJ). Se analizaron después los datos de fluorescencia empleando el test Mann Whitney con Prisma 5 (programa informático GraphPad, san Diego, CA). Los valores de $p < 0,05$ se aceptaron como significativos estadísticamente.

Resultados

ShH10 dirigida a células gliales de Müller en la retina de ratón de tipo salvaje

Previamente, se caracterizó en las retinas de las ratas (Klimczak et al. 2009) la variante ShH10 AAV, modificada genéticamente para la transducción específica mediante evolución directa, y que habían mostrado transducir casi exclusivamente las células de Müller con una pequeña cantidad de la expresión dirigida a RGCs. Para validar la especificidad de la célula de Müller de este virus en la retina de ratón, se inyectó intravítreamente $1-4,10^{11}$ vg de ShH10 que codifican GFP bajo el control de un promotor generalizado. Las inyecciones se realizaron en ratones de 7 semanas de edad y seguido semanalmente por la toma de imágenes de fluorescencia *in vivo* hasta las cuatro semanas después de la inyección. Se observó que la expresión de GFP alcanza el máximo al día 7 y permanece constante a partir de entonces. El examen histológico de la expresión de GFP en la retina reveló un patrón fuerte de expresión localizado cerca de la vasculatura principal y del nervio óptico. Las tomas de imágenes confocales de las secciones transversales de la retina y de los soportes de la retina después de la inmunotinción de GFAP, mostraron la transducción exclusiva de las células de Müller empleando ShH10 sin la expresión de GFP en los astrocitos o en las células ganglionares de la retina (RGCs). En conclusión, ShH10-GFP en ratones de tipo salvaje es altamente selectivo para las células de Müller.

Transducción de células de Müller con ShH10-GFP en la retina de ratón con Dp71 nulo

Para analizar la morfología de las células de Müller en los ratones con Dp71 nulo, se administro ShH10-GFP a un título equitativo en el vítreo de los ratones con Dp71 nulo. Los patrones de transducción se compararon con las retinas de tipo salvaje mediante un oftalmoscopio de escaneo láser (SLO) 15 días después de la inyección. Un mes después de la inyección de las retinas se tomaron imágenes y se contrastaron. Los ratones con Dp71 nulo mostraron una intensidad mayor y más generalizada en la transducción de células de Müller en comparación con los ratones de tipo salvaje ($n=6$). Empleando estos montones confocales adquiridos empleando las mismas configuraciones, comparamos los niveles de transducción en las células de Müller mediante la cuantificación de la extensión del área GFP marcada y de la intensidad de GFP para cada retina. El área de fluorescencia era aproximadamente 2 veces más grande en los ratones con Dp71 nulo que en los ratones de tipo salvaje, y la intensidad de fluorescencia era aproximadamente 6 veces mayor en los ratones con Dp71 nulo que en los ratones de tipo salvaje. Se examinaron las interacciones entre las células gliales de Müller marcadas con GFP y los astrocitos empleando imágenes confocales de mayor aumento después del marcaje de GFAP. Esto mostró que ShH10 no transduce ningún astrocito y se observaron interacciones similares entre los astrocitos y los vasos sanguíneos en ambas retinas. Se confirmó también la mayor selectividad de ShH10 para las células de Müller en las secciones de agarosa en ratones con Dp71 nulo, mostrando que no hay expresión en otro tipo de células empleando ShH10. Estos resultados muestran colectivamente que las células de Müller se pueden transducir de manera más fácil e intensa por ShH10 en ausencia de Dp71. Además, el marcaje de las células de Müller muestra que su base final está más extendida en ausencia de Dp71 que en los ratones de tipo salvaje, confirmando las observaciones previas (Fort et al. 2008).

La membrana limitante del interior está alterada en ratones con Dp71 nulo

Las bases finales de las células de Müller están deformadas en ausencia de Dp71 (Fort et al. 2008), y esto podría contribuir a cambios en la estructura de la membrana interna (ILM) además de la filtración de la BRB descrita anteriormente. Para comparar las características de la ILM en los ratones de tipo salvaje y en los ratones con Dp71 nulo, se examinaron en relación a la ILM las secciones transversales de las retinas con Dp71 nulo con las células de Müller marcadas con GFP. La ILM se marcó con un anticuerpo anti-laminina ya que la laminina es una de las diez proteínas de la matriz extracelular secretada por la base final de las células de Müller con nidogen1 y 2, colágeno 4, perlecan, colágeno 18 y agrina (Halfter et al. 2008) que constituyen la ILM. La ILM y todas las capas de las retinas de ratón con Dp71 nulo eran más delgadas que la de los ratones de tipo salvaje. La ILM y el resto de la arquitectura de la retina se alteró en ausencia de Dp71 posiblemente por la mejora en la eficacia de la transducción de la retina por el AAV. Queríamos confirmar nuestras observaciones inmunohistoquímicas mediante la toma de imágenes OCT *in vivo*. Empleamos la toma de imágenes OCT ya que es la técnica más fiable para obtener los datos de medición *in*

vivo sin ningún tratamiento químico del tejido que pueda alterar su estructura. Por tanto, la toma de imágenes OCT se realizó a 100 µm alrededor del nervio óptico en 8 ojos de cada cepa. Después de las mediciones realizamos proyecciones Z de las imágenes OCT a 500 µm a partir del nervio óptico: (i) la retina entera, a partir del epitelio pigmentario de la retina (RPE) hasta la capa de la célula ganglionar (GCL); (ii) la capa del fotorreceptor compuesta por los segmentos externos (OS) y los segmentos internos (IS); (iii) la capa nuclear externa (ONL); (iv) y la retina interna que consiste en la capa nuclear interna (INL), la capa plexiforme interna (IPL), la GCL y la ILM. Después del análisis estadístico, demostramos que cada capa celular de la retina es significativamente más delgada en los ratones con Dp71 nulo que en los ratones de tipo salvaje. Esta observación confirma los resultados obtenidos mediante la inmunotinción de las criosecciones.

5 La inyección intravítrea de AAV5-GFP traduce fuertemente los fotorreceptores en la retina de ratones con Dp71 nulo

10 Se ha demostrado que la digestión suave de la ILM con una proteasa no específica mejora la transducción de múltiples tipos de células de la retina a partir del vítreo, con un AAV5 que media particularmente una expresión considerable de la capa del fotorreceptor (Dalkara et al. 2009). El AAV5 se conoce no sólo por transducir las células fotorreceptoras cuando se inyecta subretinalmente sino también cuando se altera la ILM de la retina (Dalkara et al. 2009; Kolstad et al. 2010; Li et al. 2009). En base a este conocimiento, ensayamos la capacidad del AAV5 para transducir los fotorreceptores de la retina después de la inyección en el vítreo de los ratones con Dp71 nulo para ensayar la hipótesis de una ILM alterada. Como anticipamos, un mes después de la inyección intravítrea de AAV5-GFP, obtuvimos una fuerte transducción del fotorreceptor a través de toda la retina en ratones con Dp71 nulo mientras que en la retina de tipo salvaje la expresión de GFP no fue detectable. Las secciones de agarosa confirman además que la expresión de GFP está restringida a la capa del fotorreceptor. La reducción general en el espesor de la retina podría contribuir también a esta observación.

15 20

La barrera sanguínea de la retina de ratones con Dp71 nulo no es permeable a AAVs

25 Sabiendo que en los ratones con Dp71 nulo, la BRB es permeable a determinadas moléculas tan ampliamente como para el BSA, quisimos ensayar la extensión de esta permeabilidad para las partículas, tal como a AAV. Comprobamos si el ShH10-GFP inyectado intravítreamente puede cruzar la BRB para ir dentro del flujo sanguíneo. Recogimos sangre a partir de los ratones de tipo salvaje y los ratones con Dp71 nulo, 24, 48 y 72 horas después de la inyección intravítrea de ShH10-GFP y se midió la presencia del ADN viral en la sangre recogida para cada punto de tiempo empleando PCR. No fuimos capaces de amplificar el GFP ADN del flujo sanguíneo de ambas cepas de ratones, indicando que la BRB no es permeable a los virus cuando se inyectaron en el vítreo. Como control positivo, el AAV inyectado en el flujo sanguíneo a través de la vena del pene mostró claramente la presencia del transgen GFP en la circulación. Este resultado es alentador para el desarrollo de la terapia génica ocular dirigida a tratar enfermedades que muestran una degradación de la BRB.

30

Discusión

35 Varias enfermedades de la retina se asocian con la degradación del fenotipo de la barrera sanguínea de la retina y es de importancia la comprensión de los mecanismos moleculares que contribuyen a la integridad de las barreras de la retina. El ratón con Dp71 nulo es un buen modelo animal para estudiar la implicación de las células gliales de Müller en el mantenimiento de las barreras de la retina. De hecho, la ausencia de Dp71, expresada más abundantemente en las células gliales de Müller, conduce a la degradación de la barrera sanguínea de la retina en este ratón.

40 Para entender la implicación de las células gliales de Müller en la permeabilidad de la retina en el ratón Dp71, se empleó una variante de AAV modificada genéticamente llamada ShH10 para marcar estas células. Después se comparó la interacción entre las células gliales de Müller, la vasculatura de la retina (BRB) y la membrana limitante interna en la retina con Dp71 nulo en comparación con la retina de tipo salvaje. ShH10 conduce a una expresión del transgen específica y eficaz en las células gliales de Müller, tanto en las retinas con Dp71 nulo como en las retinas de tipo salvaje. Sin embargo, los patrones de transducción eran notablemente diferentes en estas dos retinas. En el ratón de tipo salvaje, ShH10 conduce a una transducción intensa y específica de las células de Müller en la proximidad de los vasos sanguíneos de la retina. Es bien conocido que la ILM es más delgada al lado de los principales vasos sanguíneos de la retina (Yanoff y Fine 1996), y que la base final de la célula glial de Müller se enrolla alrededor de los vasos sanguíneos lo que explica este típico patrón de transducción junto a la vasculatura principal observada después de la inyección intravítrea de las partículas de AAV en una retina normal. De manera interesante, en el ratón con Dp71 nulo, ShH10 transduce un área mayor de la retina, y conduce a una expresión genética más fuerte en las células de Müller. Esto refleja un mejor acceso viral en la base final de la célula de Müller en el ratón con Dp71 nulo. En ausencia de Dp71, la base final de la célula de Müller es mayor y más extendida (Fort et al. 2008) presentando una mayor superficie de contacto para los virus en la ILM. Además, la distribución de laminina, un constituyente principal de la ILM que normalmente se une a α/β -dístroglicano (Claudepierre et al. 2000) se regula a la baja alrededor de la base final de la célula de Müller cuando el dístroglicano se dispersa a través del cuerpo de las células gliales (Fort et al. 2008). Todos estos fenómenos que implican a las células de Müller y al Dp71 contribuyen posiblemente al adelgazamiento general de la retina en ausencia de Dp71, así como al adelgazamiento y a la permeabilización de las barreras de la retina.

45 50 55

El adelgazamiento de la ILM es particularmente importante a partir de un punto de vista de la transducción viral cuando la administración intravítrea de los vectores AAV está obstaculizada por la presencia de esta membrana (Dalkara et al. 2009; Ivanova et al. 2010; Yin et al. 2011). La vía de administración intravítrea es la vía de administración preferida para acceder a la retina porque es no invasiva y conduce a una administración pan-retinal. Los métodos de administración genética actuales requieren de una inyección subretiniana lesiva para alcanzar la retina externa y sólo transducir una fracción de la retina (Jacobson et al. 2012). Ha habido varios estudios que arrojan luz sobre cómo la ILM actúa como una barrera para la transducción de la retina mediante los AAVs (Aartsen et al. 2010; Cehajic-Kapetanovic et al. 2011, Dalkara et al. 2009; Kolstad et al. 2010). Anteriormente se ha demostrado que la digestión suave de la ILM con una proteasa no específica, incrementa el acceso viral a la retina (Dalkara et al. 2009). De manera similar, se ha demostrado que (Aartsen et al. 2010) la transducción de las células gliales de Müller mediante AAV6, un serotipo de AAV similar a ShH10, se mejora mediante la alteración de la ILM mediante tratamiento con colagenasa. En este estudio, el patrón de la expresión de GFP continúa en los vasos principales de la retina de tipo salvaje, mientras que la expresión de GFP incrementa a través de la retina después de la digestión suave de la ILM con colagenasa, de manera similar a nuestras observaciones en la retina de Dp71 nulo. En paralelo, se ha demostrado que la enfermedad degenerativa de la retina puede causar que la ILM pueda verse comprometida, proporcionando un mejor acceso a las partículas virales (Koldstad et al. 2010). En conjunto, estos descubrimientos nos conducen a formular la hipótesis de que la ausencia de Dp71 podría conducir a una ILM más permisiva. Como la visualización selectiva de la ILM presenta dificultades, ensayamos la hipótesis de una ILM permeable mediante la aplicación de otro serotipo AAV, que no puede transducir células de la retina a través de una ILM intacta. El serotipo AAV 5, es capaz de transducir los fotorreceptores de la retina cuando se aplica subretinalmente pese a que no conduce la transducción de la retina en el vítreo de roedores de tipo salvaje porque sus receptores de unión primaria están protegidos por la ILM y las neuronas internas. Observamos que el AAV5 conduce a la transducción pan-retinal del fotorreceptor en el ratón con Dp71 nulo, confirmando que la ILM de esta cepa de ratón es permisiva permitiendo el acceso retinal más profundo a este serotipo. Como una perspectiva, podemos imaginar que la inhibición transitoria de Dp71 a través del ARNsi es una forma prometedora para incrementar la transducción de los fotorreceptores permitiendo a los AAVs, tal como a AAV5, administrarse a través del vítreo.

Después de la separación de la retina la expresión de Dp71 se regula a la baja, demostrando el papel clave de esta proteína en el mantenimiento de una permeabilidad normal de la BRB. Por tanto, la expresión de Dp71 puede restaurar potencialmente las propiedades de la barrera de la base final de la célula de Müller si podemos proporcionar la proteína exógenamente. En este contexto, este estudio preliminar de AAV mediado por el direccionamiento a células gliales de Müller sienta las bases para el desarrollo de la terapia génica retiniana destinada a restaurar la expresión de Dp71 en la enfermedad retiniana con la BRB permeable. Un obstáculo potencial para el desarrollo de la terapia génica con AAV para las enfermedades oculares con la BRB comprometida es la filtración de virus hacia el flujo sanguíneo. Por tanto, analizamos las muestras sanguíneas a partir de los ratones inyectados intravítreamente con ShH10-GFP para detectar la presencia de partículas virales en el flujo sanguíneo. No encontramos evidencia del transgen GFP en la circulación de los ratones con Dp71 nulo o de tipo salvaje después de la administración intravítrea con ShH10.

En conclusión, la ILM de los ratones con Dp71 nulo es más delgada y más permeables a distintos serotipos de AAV después de la inyección intravítrea aunque la BRB de estos ratones permanece selectiva a las partículas AAV. Estos descubrimientos son alentadores para el desarrollo de terapias génicas para enfermedades con la BRB comprometida y los ratones con Dp71 nulo ofrecen un buen modelo para el estudio de las patologías que muestran una degradación de la BRB, tal como la AMD, la retinopatía diabética y la MacTel 2 (telangiectasia macular de tipo 2).

45 Referencias

A través de esta solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que esta divulgación pertenece.

Aartsen WM, van Cleef KW, Pellissier LP, Hoek RM, Vos RM, Blits B, Ehlert EM, Balaggan KS, Ali RR, Verhaagen J y otros. 2010. GFAP-driven GFP expression in activated mouse Muller glial cells aligning retinal blood vessels following intravitreal injection of AAV2/6 vectors. *PLoS One* 5(8):e12387.

Aurnhammer C, Haase M, Muether N, Hausl M, Rauschhuber C, Huber I, Nitschko H, Busch U, Sing A, Ehrhardt A y otros. 2012. Universal time-real PCR for detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived terminal repeat sequences. *Hum Gene Ther Methods* 23(1):18-28.

Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N y otros. 2008. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358(21):2231-9.

Cehajic-Kapetanovic J, Le Goff MM, Allen A, Lucas RJ, Bishop PN. 2011. Glycosidic enzymes enhance retinal transduction following intravitreal delivery of AAV2. *Mol Vis* 17:1771-83.

- Choi WW, Asokan A, Haberman RA, Samulski RJ. 2007a. Production of recombinant adeno-associated viral vectors. *Curr Protoc Hum Genet* Capítulo 12:Unidad 12 9.
- Choi WW, Asokan A, Haberman RA, Samulski RJ. 2007b. Production of recombinant adeno-associated viral vectors for in vitro and in vivo use. *Curr Protoc Mol Biol* Capítulo 16:Unidad 16 25.
- 5 Cideciyan AV, Aleman TS, Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S, Roman AJ, Pang JJ, Sumaroka A, Windsor EA, Wilson JM y otros. 2008. Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 105(39):15112-7.
- Claudepierre T, Mornet D, Pannicke T, Forster V, Dalloz C, Bolanos F, Sahel J, Reichenbach A, Rendon A. 2000. Expression of Dp71 in Muller glial cells: a comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(1):294-304.
- 10 Dalkara D, Kolstad KD, Caporale N, Visel M, Klimczak RR, Schaffer DV, Flannery JG. 2009. Inner limiting membrane barriers to AAV-mediated retinal transduction from the vitreous. *Mol Ther* 17(12):2096-102.
- Fort PE, Sene A, Pannicke T, Roux MJ, Forster V, Mornet D, Nudel U, Yaffe D, Reichenbach A, Sahel JA y otros. 2008. Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Muller retinal glial cell membrane. *Glia* 56(6):597-610.
- 15 Halfter W, Dong S, Dong A, Eller AW, Nischt R. 2008. Origin and turnover of ECM proteins from the inner limiting membrane and vitreous body. *Eye (Lond)* 22(10):1207-13.
- Hosoya K, Tachikawa M. 2012. The inner blood-retinal barrier: molecular structure and transport biology. *Adv Exp Med Biol* 763:85-104.
- 20 Ivanova E, Hwang GS, Pan ZH, Troilo D. 2010. Evaluation of AAV-mediated expression of Chop2-GFP in the marmoset retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51(10):5288-96.
- Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, Peden MC, Aleman TS, Boye SL, Sumaroka A y otros. 2012. Gene therapy for Leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. *Arch Ophthalmol* 130(1):9-24.
- 25 Klimczak RR, Koerber JT, Dalkara D, Flannery JG, Schaffer DV. 2009. A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Muller cells. *PLoS One* 4(10):e7467.
- Kolstad KD, Dalkara D, Guerin K, Visel M, Hoffman N, Schaffer DV, Flannery JG. 2010. Changes in adeno-associated virus-mediated gene delivery in retinal degeneration. *Hum Gene Ther* 21(5):571-8.
- Li W, Kong F, Li X, Dai X, Liu X, Zheng Q, Wu R, Zhou X, Lu F, Chang B y otros. 2009. Gene therapy following subretinal AAV5 vector delivery is not affected by a previous intravitreal AAV5 vector administration in the partner eye. *Mol Vis* 15:267-75.
- 30 Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Jr., Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM y otros. 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358(21):2240-8.
- 35 Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. 1999. Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Hum Mol Genet* 8(1):1-10.
- Sene A, Tadayoni R, Pannicke T, Wurn A, El Mathari B, Benard R, Roux MJ, Yaffe D, Mornet D, Reichenbach A y otros. 2009. Functional implication of Dp71 in osmoregulation and vascular permeability of the retina. *PLoS One* 4(10):e7329.
- 40 Shen W, Fruttiger M, Zhu L, Chung SH, Barnett NL, Kirk JK, Lee S, Coorey NJ, Killingsworth M, Sherman LS y otros. 2012. Conditional Muller cell ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model. *J Neurosci* 32(45):15715-27.
- Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B. 2012. Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Mol Neurobiol* 45(1):43-60.
- 45 Yanoff M, Fine BS. 1996. *Ocular Pathology*: Mosby-Wolfe.
- Yin L, Greenberg K, Hunter JJ, Dalkara D, Kolstad KD, Masella BD, Wolfe R, Visel M, Stone D, Libby RT y otros. 2011. Intravitreal injection of AAV2 transduces macaque inner retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(5):2775-83.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector que contiene un polinucleótido de interés en combinación con una cantidad de un inhibidor de la expresión de Dp71, para usar en un método de tratamiento, o prevención, o inhibición de enfermedades retinianas para expresar el polinucleótido de interés en la retina de un sujeto mediante inyección intravítrea en donde el inhibidor de Dp71 se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ARN anti-sentido, moléculas de ADN anti-sentido, moléculas de ARN bicatenario pequeño (ARNds) y ARNs inhibitorios pequeños (ARNsi).
- 10 2. La combinación para usar según la reivindicación 1 en donde el sujeto está afectado o probablemente está afectado con una enfermedad retiniana.
- 10 3. La combinación para usar según la reivindicación 2 en donde la enfermedad retiniana es una enfermedad retiniana hereditaria o una enfermedad retiniana adquirida.
- 15 4. La combinación para usar según la reivindicación 3 en donde la enfermedad retiniana adquirida es una degeneración macular, tal como degeneración macular relacionada con la edad, o retinopatía diabética.
- 15 5. La combinación para usar según la reivindicación 3 en donde la enfermedad retiniana hereditaria se selecciona del grupo que consiste en el síndrome de Bardet-Biedl; síndrome de Bassen-Kornzweig, enfermedad de Best, coroidema, atrofia girada, amaurosis congénita de Leber, síndrome de Refsun, enfermedad de Stargardt; distrofia de conos y bastones; ceguera nocturna estacionaria congénita; degeneración macular; atrofia óptica; retinitis pigmentosa; retinopatía sintromica o sistémica; y síndrome de Usher.
- 20 6. La combinación para usar según la reivindicación 1 en donde el polinucleótido codifica un polipéptido que se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos neuroprotectores; polipéptidos anti-angiogénicos; factores neurotróficos.
- 25 7. La combinación para usar según la reivindicación 1 en donde el producto de polinucleótido es una endonucleasa específica del sitio, tal como una TALE-nucleasa, meganucleasa o nucleasa con dedos de Zinc.
8. La combinación para usar según la reivindicación 1 en donde el producto del polinucleótido es un ARN de interferencia (ARNi).
9. La combinación para usar según la reivindicación 1 en donde el vector es un virus adeno-asociado (AAV) recombinante.
- 30 10. La combinación para según la reivindicación 10 en donde el AAV se selecciona del grupo que consiste en AAV tipo 1 (AAV-1), AAV tipo 2 (AAV-2), AAV tipo 3 (AAV-3), AAV tipo 4 (AAV-4), AAV tipo 5 (AAV-5), AAV tipo 6 (AAV-6), AAV tipo 7 (AAV-7), AAV tipo 8 (AAV-8) y AAV tipo 9 (AAV9).
- 35 11. La combinación para usar según la reivindicación 1 en donde el vector y el inhibidor de la expresión de Dp71 se inyectan simultánea o secuencialmente en el vítreo del sujeto.
- 40 12. Una composición farmacéutica que comprende el vector que contienen el polinucleótido de interés en combinación con una cantidad de un inhibidor de la expresión de Dp71 para usar en el tratamiento de una enfermedad retiniana para expresar un polinucleótido de interés en la retina de un sujeto mediante inyección intravítrea, en donde el inhibidor de Dp71 se selecciona del grupo que consiste en moléculas de ARN anti-sentido, moléculas de ADN anti-sentido, ARN bicatenario pequeño (ARNds) y ARNs inhibitorios pequeños (ARNsi).