

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 499**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/51 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2015 PCT/GB2015/050516**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2015 WO15128624**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2015 E 15707722 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 3110433**

54 Título: **Tratamiento de la degeneración retinal mediante terapia génica**

30 Prioridad:

25.02.2014 GB 201403260

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

14.02.2020

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF MANCHESTER (100.0%)
Oxford Road
Manchester M13 9PL, GB**

72 Inventor/es:

**LUCAS, ROBERT;
BISHOP, PAUL y
CEHAJIC-KAPETANOVIC, JASMINA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 742 499 T3

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

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de la degeneración retinal mediante terapia génica

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición terapéutica para usar en un método mejorado para tratar la enfermedad degenerativa de la retina, proporcionando una función fotorreceptora a una célula. La presente invención también se refiere a kits, en particular para uso en tales métodos.

Antecedentes de la invención

10 La retina del ojo de vertebrados cumple la misma función que una película en una cámara, recibiendo una imagen visual creada por la luz que pasa a través de la lente y la córnea del ojo. La imagen recibida se traduce en señales químicas y eléctricas que se transmiten al cerebro a través del nervio óptico.

15 La retina es una estructura compleja, que comprende diez capas distintas de diferentes tipos de células. De estas capas, es la capa fotorreceptora la responsable de traducir la luz entrante en una señal química y/o eléctrica que el cerebro puede leer e interpretar en una imagen. La capa fotorreceptora comprende células fotosensibles de dos tipos, conocidas como bastones y conos. Estos tipos de células son responsables de reaccionar a la luz entrante y producir una señal eléctrica, pero difieren en su posición dentro de la retina y el tipo de luz a la que reaccionan. Específicamente, los bastones funcionan principalmente con poca luz y se encuentran predominantemente en la retina periférica. Los conos son más reactivos a la luz brillante (es decir, la visión diurna) son responsables de la visión del color y se encuentran en la densidad más alta en la retina central. La retina también contiene un tercer tipo menos numeroso de células fotorreceptoras, las células ganglionares fotosensibles, que son responsables de medir la luz de fondo, pero no del procesamiento de imágenes.

20 Los bastones y conos de la capa fotorreceptora de la retina pueden reaccionar a la luz y convertirla en una señal eléctrica debido a la presencia de pigmentos fotosensibles (denominados fotopigmentos), que sufren un cambio químico cuando la célula está expuesta a la luz. Estos fotopigmentos son receptores acoplados a proteínas G. Los fotopigmentos comprenden una fracción de proteína que está acoplada a un cofactor cromóforo conocido como retinal. La exposición a la luz provoca una isomerización del cofactor retinal desde un cis-retinal hasta un trans-retinal, que a su vez provoca un cambio conformacional en la proteína opsina, conocida como fotoblequeo. Este es el primer paso en una cascada de señalización que resulta en una señal transmitida a lo largo del nervio óptico. Para retener la fotosensibilidad, las opsinas necesitan un suministro continuo de cis-retinal. Ni las células fotorreceptoras de bastones ni de conos pueden producir cis-retinal por sí mismas. La principal fuente de cis-retinal en la retina es el RPE (epitelio pigmentario de la retina) que toma todo el trans-retinal de la opsina blanqueada y produce cis-retinal. En la retina intacta, los bastones y los conos se apoyan en el RPE, lo que les permite acceder a este cromóforo regenerado.

25 En los humanos, existen varios fotopigmentos estrechamente relacionados, conocidos como la familia opsina. En los seres humanos, estos comprenden 3 opsinas de conos que son sensibles a diferentes longitudes de onda (el origen de la visión del color), la rodopsina que se encuentra en los bastones y la melanopsina que se encuentra en los fotorreceptores de las células ganglionares. Las opsinas de los conos incluyen opsina LWS para el verde amarillento, opsina MWS para el verde y opsina SWS para el violeta azulado. Estas opsinas muestran una identidad de secuencia alta.

30 Las condiciones tales como las distrofias retinales causan ceguera debido a la destrucción de los fotorreceptores en la retina externa (es decir, los bastones y los conos). Estas condiciones pueden ser el resultado de un daño directo a los fotorreceptores o la destrucción indirecta de los fotorreceptores como resultado de una patología en el epitelio y/o coroides del pigmento retinal. La discapacidad visual severa es común en las etapas avanzadas de la degeneración. Estas condiciones son actualmente incurables. Las distrofias retinales se pueden dividir en distrofias de conos y bastones (también llamadas retinitis pigmentosa), distrofias de conos y bastones y distrofias maculares. En las distrofias de conos y bastones, los fotorreceptores de los bastones se degeneran, lo que resulta en una pérdida de visión periférica y de la visión nocturna, y con frecuencia esto es seguido por la destrucción del cono que conduce a una pérdida de visión central y del color. Por el contrario, en las distrofias de conos y bastones, inicialmente hay una pérdida de fotorreceptores de conos que conduce a una pérdida de visión detallada y de color, y esto es seguido por una degeneración de los bastones que resulta en una pérdida de visión periférica y ceguera nocturna. Ambas formas pueden provocar ceguera con pérdida extensa o completa del campo visual. Otro tipo de distrofia retinal llamada distrofia macular resulta en una pérdida de visión central, pero se preserva la visión periférica.

35 Sin embargo, a pesar de la pérdida de fotorreceptores retinales externos, las neuronas retinales internas, incluidas las células bipolares y las células ganglionares de la retina, pueden sobrevivir y retener su capacidad de enviar información visual al cerebro. Por lo tanto, estas neuronas proporcionan un nicho prometedor para las terapias optogenéticas emergentes que tienen como objetivo convertirlas en fotorreceptores directamente visuales y recrear la fotosensibilidad que se ha perdido con la degeneración. Varias estrategias terapéuticas han mostrado resultados prometedores en intentos de reemplazar o revivir estas neuronas retinales internas y restaurar la visión. El trasplante de células fotorreceptoras, o sus líneas progenitoras, es un enfoque importante en el estudio preclínico y se ha demostrado que restaura la visión a ratones ciegos en la etapa tardía de la degeneración después de la pérdida completa de fotorreceptores. En un intento

por revivir las neuronas retinales internas, las prótesis electrónicas implantables han provocado el disparo de las células ganglionares de la retina (RGC) a través de cámaras externas y han proporcionado una discriminación espacial cruda para al menos algunos pacientes (Zrenner E, et al.2011, Proc Biol Sci 278 (1711): 1489-1497; Humayun MS, et al.2012, Ophthalmology 119, 779-788). Otra estrategia utiliza opsinas microbianas como fotointerruptores de la actividad neuronal y se han utilizado para provocar actividad evocada por la luz en retinas degeneradas. En este sentido, se ha demostrado que la inyección intravítrea de un vector AAV-2 que porta el gen de la canalodopsina-2 (ChR2) en el ratón rd1 conduce a la despolarización activada por la luz o las respuestas 'ENCENDIDA' en RGC y potenciales evocados visualmente en la corteza. Este estudio dirigido por Bi et al. (Bi A, et al., 2006, Neuron. 2006; 6; 50 (1): 23-33)) proporcionaron la primera prueba de principio de que la función retinal se puede restaurar mediante la optogenética. (Lagali PS, et al., 2008, Nat Neurosci. Junio de 2008; 11 (6): 667-75; Cronin T, et al., 2014, EMBO Mol Med. Agosto 4 de 2014; 6 (9): 1175-90; Mace E et al., 2014, Mol Ther. Enero de 2015; 23 (1): 7-16), así como fotorreceptores de cono (Busskamp V, et al., 2010, Science. 23 de julio de 2010; 329 (5990): 413-7) han sido exitosamente convertidos en sensores de luz artificial que conducen al rescate parcial de la función visual en ratones ciegos. Además, los fotointerruptores sintéticos desarrollados recientemente han mostrado resultados prometedores en el rescate de la visión en ratones ciegos. Los fotointerruptores a base de azobenceno de 'un componente' utilizan moléculas pequeñas, AAQ o DENAQ (Polosukhina A, et al., 2012, Neuron. 26 de julio de 2012; 75 (2): 271-82; Tochitsky I, et al., 2014, Neuron. 19 de febrero de 2014; 81 (4): 800-13) que fotosensibilizan directamente los canales iónicos nativos de las neuronas. Los fotosinterruptores de 'dos componentes', LiGluR/MAG, (Caporale N, et al., 2011, Mol Ther. Julio de 2011; 19 (7): 1212-9; Gaub BM, et al., 2014, Proc Natl Acad Sci USA. Dic. 23 de 2014; 111 (51): E5574-83) primero expresan genéticamente el receptor de glutamato ionotrópico activado por luz modificado sintéticamente (LiGluR) en las retinas y luego requieren la adición de una molécula de fotointerruptora (MAG) para la activación. Ambos sistemas han demostrado impartir sensibilidad a la luz a ratones ciegos y retinas de caninos (Gaub BM, et al., 2014, Proc Natl Acad Sci US A. 23 de diciembre de 2014; 111 (51): E5574-83) y restaurar funciones visuales básicas en roedores.

Sin embargo, todavía son necesarias mejoras en el tratamiento de estas afecciones.

La presente invención tiene como objetivo superar o mejorar los problemas asociados con el tratamiento de la degeneración de la retina.

Breve resumen de la invención

Por lo tanto, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina, en la que la composición terapéutica comprende un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana, en la que el vector comprende un promotor unido operativamente al ácido nucleico en el que el promotor dirige la expresión ubicua o específica de neurona en células retinales internas, en las que las células retinales internas comprenden células bipolares de ENCENDIDO o células bipolares de APAGADO.

En este documento se describe una composición que comprende i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible y ii) una enzima de degradación de la matriz extracelular. Preferiblemente, la composición es terapéutica.

Se describe en el presente documento i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible; y ii) una enzima de degradación de la matriz extracelular, para usar en un método para proporcionar la función fotorreceptora a una célula.

En el presente documento se describe un método para proporcionar la función fotorreceptora a una célula, comprendiendo el método introducir en un ojo un vector de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana. En este método, preferiblemente el vector se introduce sin la administración de una enzima de degradación de la matriz extracelular (por ejemplo, se introduce sin la administración conjunta de una enzima, en la que la administración conjunta incluye la administración separada, secuencial o combinada durante la misma terapia). El método puede comprender además expresar el vector en células retinales internas, en el que la expresión de la proteína fotorreceptora humana produce un fotorreceptor de células retinales internas.

En este documento se describe un vector de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana.

Descripción de los dibujos

Las realizaciones de la invención se describen adicionalmente a continuación con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra inyecciones intraoculares y administración de genes a través de AAV;

La Figura 2 muestra la restauración del reflejo pupilar a la luz después del tratamiento con rodopsina;

La Figura 3A-E muestra datos de registros de electrofisiología *in vivo*; F) Mapa de calor de respuestas de luz dLGN *in vivo* representativas de ratones Rd1 (n = 5) en el que un ojo se trató con opsina de bastón, CAG-hRho (B) y el otro con GFP,

CAG-GFP (C) que representa la diversidad de respuestas restauradas: sostenida, transitoria, de ENCENDIDO y APAGADO. Las respuestas se ordenaron de acuerdo con la amplitud de la respuesta sostenida durante el primer segundo inicial de una presentación de estímulo de luz de 2 segundos (15,4 log fotones/cm²/s); G-J) Histogramas representativos de tiempo de estímulo periférico (PSTH) que muestran la respuesta promedio a múltiples presentaciones de destellos de campo completo (15,4 log fotones/cm²/s) para ENCENDIDO sostenido (G), ENCENDIDO transitorio (H), APAGADO (I) y ENCENDIDO-APAGADO (J). Los recuentos correspondientes de cajones de prueba (TBC) se muestran en la parte superior de cada PSTH.

La Figura 4 muestra datos de registros de MEA *in vitro*;

La Figura 5 muestra que las respuestas observadas son claramente distintas de las respuestas de luz nativas normalmente presentes en la retina de ratón rd1 después de la estimulación con luz.

La Figura 6 muestra las respuestas de dLGN en el ratón rd1 impulsadas por ojos tratados con opsina de bastones que responden en un rango de intensidades de luz y en condiciones adaptadas de luz A) Perfil de respuesta de sensibilidad (PSTH y TBC) de cinco unidades representativas de dLGN de ratones Rd1-CAG-hRho que recibieron destellos de campo completo a diferentes intensidades de luz (ND2 = 13,4, ND1 = 14,4 y ND0 = 15,4 log fotones/cm²/s); B) Perfil de respuesta de sensibilidad de contraste (PSTH y TBC) de cuatro unidades representativas de dLGN de ratones Rd1-CAG-hRho registrados en condiciones adaptadas a la luz (contraste de Michelson 96% a ND0 = 15,4 log fotones/cm²/s).

La Figura 7 muestra que la expresión dirigida de la opsina de bastones a las células bipolares de ENCENDIDO restaura las respuestas visuales en las retinas rd1 ciegos: A) el constructo de ADN del vector AAV2 que conduce la expresión dirigida de opsina de bastones humanos bajo el promotor Grm6; B, C) Ejemplos de imágenes de microscopio de fluorescencia de una sección a través de la retina del ratón después del suministro intravítreo del vector viral en A junto con enzimas glucosídicas que descomponen la matriz extracelular (B). Imágenes fluorescentes de gran aumento que representan la localización membranosa de la opsina de bastones en somas celulares de células INL (C). Las retinas se trataron con anticuerpo α -hRho (rojo) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de calibración = 50 μ m. GCL = capa de células ganglionares, IPL = capa plexiforme interna, INL = capa nuclear interna.

La Figura 8 muestra histogramas representativos de tiempo de estímulo periférico (PSTH) que muestran respuestas promedio a múltiples presentaciones de destellos de campo completo de 5 segundos a ND0 = 15,4 log fotones/cm²/s para respuestas de ENCENDIDO (A) y APAGADA (B).

La Figura 9 muestra histogramas representativos de tiempo de estímulo periférico (PSTH) que muestran respuestas promedio a múltiples presentaciones de destellos de campo completo de 2 segundos a niveles de luz más bajos (ND2 - 13,4 log fotones/cm²/s).

La Figura 10 muestra histogramas representativos de tiempo de estímulo periférico (PSTH) que muestran respuestas promedio a múltiples presentaciones de destellos de campo completo de 5 segundos en condiciones adaptadas a la luz - contraste de Michelson 96%.

La Figura 11 muestra que la expresión ectópica de la opsina de bastones restaura el comportamiento visual en ratones rd1 ciegos tratados: A) Curvas de respuesta de irradiancia para la constricción pupilar máxima durante 10 segundos de luz blanca en un rango de intensidades de luz (A). Los ojos de rd1 tratados con opsina de bastones (expresión CAG no dirigida, rojo) muestran una mejora notable en la sensibilidad visual en comparación con los ojos de rd1 inyectados con GFP (verde). Con la expresión dirigida (Grm6, azul), el reflejo pupilar a la luz se mantuvo en gran medida afectado. Los datos para ratones de tipo silvestre inyectados con mezcla PBS/enzima se muestran para comparación (negro). Los datos se normalizan al tamaño de la pupila inmediatamente antes del inicio de la iluminación. Los valores son la media \pm SEM, con n indicando el número de animales examinados; B) Imágenes infrarrojas representativas del área de la pupila medidas en la oscuridad (línea base), en ND4 (11,8 log fotones/cm²/s) y en ND0 (15,8 log fotones/cm²/s) para ratones WT, Rd1-GFP, Rd1-CAG-hRho, Rd1-grm6-hRho; C, D) Constricción pupilar máxima media en la población de los cuatro grupos de ratones a ND4 (11,8 log fotones/cm²/s; C) y ND0 (15,8 log fotones/cm²/s; D). Número de animales examinados: WT n = 6; Rd1-GFP n = 16; Rd1-CAG-hRho n = 10; Rd1-grm6-hRho n = 6. Las barras de error son SEM.

La Figura 12 muestra diagramas de actividad de caja abierta desde oscuro (sombreado en oscuro) hasta claro (área blanca) para los cuatro grupos de ratones: WT n = 5; Rd1-GFP n = 6; Rd1-CAG-hRho n = 6; Rd1-grm6-hRho n = 5. Los valores en los gráficos son medias poblacionales de la distancia recorrida en un cajón anterior de 30 segundos \pm SEM. Los histogramas de la derecha muestran la distancia media recorrida por la población durante el período de transición de oscuro (30 segundos justo antes de la luz; barras oscuras) a claro (30 segundos después de la luz; barras blancas). Las barras de error son SEM. * p < 0,05, ** p < 0,005, prueba t de Student pareada.

Figura 13. A) Gráficos de actividad de caja abierta desde luz de pantalla gris hasta luz de parpadeo de 4Hz para Rd1-grm6-hRho (n = 5). Los datos son la media poblacional de la distancia recorrida en un cajón anterior de 30 segundos \pm SEM. B) Respuesta de parpadeo de 4Hz para ratones Rd1-GFP (n = 6), Rd1-CAG-hRho (n = 6) y Rd1-grm6-hRho (n = 5). Se muestran histogramas emparejados para cada grupo de ratones que representan solo el período de transición del gráfico de actividad completa (como se muestra para Rd1-grm6-hRho en F) desde la luz gris (30 segundos antes del parpadeo de 4 Hz) a la luz parpadeante de 4 Hz (30 segundos justo después del parpadeo de 4Hz). Los datos son la media poblacional de la distancia recorrida \pm SEM. ** p < 0,005, prueba t de Student pareada.

La Figura 14 muestra la respuesta de sensibilidad al contraste para los ratones Rd1-grm6-hRho (n = 5) que muestra la distancia recorrida antes y después del parpadeo de 4Hz con diferentes contrastes de Michelson. Para cada desempeño de contraste, solo se muestra el período de transición del gráfico de actividad que representa la distancia recorrida en los 30 segundos antes (barras blancas) y en los 30 segundos después de la presentación del parpadeo (barras a cuadros). Los datos son la media poblacional de la distancia recorrida ± SEM. * p <0,05, ** p <0,005, prueba t de Student pareada.

La Figura 15 muestra la respuesta de frecuencia de parpadeo para los ratones Rd1-grm6-hRho (n = 5) que muestra la distancia recorrida antes y después de la presentación de la luz de parpadeo de campo completo a diferentes frecuencias. Para cada respuesta de parpadeo, solo se muestra el período de transición de la gráfica de actividad comparando la distancia en los 30 segundos antes (barras grises) con la distancia en los 30 segundos después de la presentación del parpadeo (barras estampadas). Los datos son la media poblacional de la distancia recorrida ± SEM. * p <0,05, ** p <0,005, prueba t de Student pareada.

La Figura 16 muestra que la expresión dirigida de opsina de bastones restaura las respuestas a escenas de películas naturalistas: A, B) Gráficos de entramado para unidades representativas dLGN sensibles de ratones Rd1-CAG-hRho (A) y Rd1-Grm6-hRho (B) expuestos a múltiples presentaciones de una película naturalista de 30 s (ratones que se mueven en una zona abierta en vista horizontal); C) Gráficos de actividad de caja abierta desde la luz de la pantalla gris (sombreada en gris) hasta una película de búhos que se acercan (sombreada en verde) para Rd1-grm6-hRho (n = 5). Los datos son la media poblacional de la distancia recorrida en un cajón anterior de 30 segundos ± SEM;

La Figura 17 muestra la respuesta a la película naturalista para ratones Rd1-GFP (n = 6), Rd1-CAG-hRho (n = 6) y Rd1-grm6-hRho (n = 5). Se muestran histogramas emparejados para cada grupo de ratones que representan solo el período de transición desde el gráfico de actividad completa desde luz gris (30 segundos justo antes de la presentación de la película; barras blancas) hasta la película de búhos (30 segundos justo después de la película; barras negras). Los datos son la media poblacional de la distancia recorrida ± SEM. ** p <0,005, prueba t de Student pareada.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina para proporcionar la función fotorreceptora a una célula, con el fin de restaurar la fotosensibilidad en retinas degeneradas o parcialmente degeneradas. Dicha función fotorreceptora nativa se pierde con la degeneración del fotorreceptor. La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que la expresión de una proteína fotorreceptora humana en la retina interna puede proporcionar la función fotorreceptora a las células neuronales retinales internas. La expresión transgénica de una proteína fotorreceptora humana en la retina interna tiene la ventaja de minimizar los posibles efectos adversos inmunogénicos, en contraste con el uso de opsinas microbianas y matrices electrónicas, respectivamente. Además, fuera de los fotorreceptores, este GPCR tiene el potencial de secuestrar la maquinaria celular y proporcionar un mecanismo fotorreceptor completamente autónomo, capaz de soportar la detección de luz por sí solo y sin ninguna otra intervención, a diferencia de los fotointerruptores sintéticos que requieren un suministro constante y exógeno de un fotointerruptor para activación. Además, la opsina de bastones requiere luz visible para la activación, y a través de la cascada de amplificación GPCR nativa tiene el potencial de funcionar bajo intensidades de luz bajas en contraste con los sistemas actuales de fotointerruptores sintéticos o basados en canales, que no pueden amplificar señales a nivel de proteína.

La inyección intravítrea como método para la terapia génica tiene ventajas particulares en términos de ser menos desafiante técnicamente en el acceso a la retina, y reduce el riesgo de complicaciones durante la administración, en particular cuando las retinas se han adelgazado por la degradación.

La presente descripción se basa, en parte, en el descubrimiento de que la administración conjunta de una enzima de degradación de la matriz extracelular en terapia génica conduce a una mayor transducción de las células de la retina, mejorando así el resultado en términos de una mayor restauración de la visión. La divulgación representa una mejora con respecto a los métodos anteriores de terapia génica intravítrea, al permitir una mayor transducción al reducir las barreras de contacto del material genético foráneo con las células objetivo.

La aplicación combinada de terapia génica y una enzima de degradación de la matriz extracelular ha conducido a resultados sorprendentes, en particular cuando la terapia génica comprende la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica la rodopsina en el vítreo de un ojo. La rodopsina requiere que el retinal todo trans que se produce después de la transducción visual sea transportado al epitelio pigmentario de la retina (RPE) para que se convierta en retinal todo cis, que luego se transporta de regreso a los bastones para una respuesta visual adicional. Se cree que este reciclaje depende del contacto íntimo entre los bastones y el RPE. Las células retinales internas, incluso en presencia de distrofias retinales en las que se degeneran los bastones y los conos, no se asociarían físicamente con el RPE de la misma manera. Los presentes inventores han observado inesperadamente que proporcionar rodopsina a las células retinales internas mediante terapia génica produce una respuesta visual, a pesar de la falta de contacto entre las células retinales internas que funcionan y el RPE. Además, se cree que las células retinales internas no tienen la maquinaria intracelular necesaria para trabajar en conjunto con la rodopsina para producir una señal eléctrica que luego podría transmitirse a través del cerebro por las células ganglionares.

Los resultados son aún más sorprendentes porque la rodopsina funciona hiperpolarizando las células en respuesta a la

luz (la capacidad equivalente a "apagar" las células), donde se puede suponer que la visión requeriría que las células retinales internas se despolarizaran ("se encendieran") por la luz.

En este documento se describe la administración de una enzima de degradación de la matriz extracelular en combinación con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible para restaurar la función fotosensible a la retina. La retina y el vítreo comprenden una variedad de moléculas de matriz extracelular, incluidos los proteoglicanos (con diferentes clases de cadenas de glicosaminoglicanos (GAG)) como los proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG), los proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPG) y los proteoglicanos de sulfato de dermatano (DSPG); hialuronano, colágenos como el colágeno tipo IV en la lámina limitante interna; lamininas; nidógeno 1 y 2, y una variedad de otras proteínas y glicoproteínas que son conocidas por los expertos en la materia.

5 Se prevé que se pueda utilizar cualquier enzima, que sea capaz de degradar una proteína o carbohidrato de la matriz extracelular (como el glicosaminoglicano) presente en el vítreo y/o en la retina y/o la membrana limitante interna, y/o la matriz extracelular retinal. En particular, una enzima para su uso puede ser una que sea capaz de degradar una proteína de la matriz extracelular o carbohidrato que se proporciona en la retina, o una proteína de la matriz extracelular o carbohidrato que se proporciona en el camino entre el vítreo y las células de la retina y que por lo tanto puede impactar sobre la transducción de una secuencia de ácido nucleico. Se prefieren las enzimas que degradan los glicosaminoglicanos (GAG).

20 Se puede seleccionar una proteína de degradación de la matriz extracelular del grupo que consiste en una colagenasa, hialuronano liasa, heparinasa I, heparinasa II, heparinasa III, condroitina ABC liasa, condroitina AC liasa, una metaloproteínasa, una ADAMTS, una plasmina (serina proteasa plasmina o su forma truncada microplasmina (Ocriplasmina)), elastasa y catepsina G de neutrófilos, neuraminidasa, N-glicanasa, O-glicanasa y pronasa. Se puede seleccionar una enzima particularmente preferida del grupo que consiste en hialuronano liasa de *Streptomyces hyalurolyticus* (EC 4.2.2.1; contenido en el GenBank acceso CP003990); Hialuronidasa de testículos de bovino (EC 3.2.1.35); condroitina ABC liasa de *Proteus vulgaris* (EC 4.2.2.4) y heparinasa III de *Flavobacterium heparinum* (EC 4.2.2.8; GenBank acceso L12534, preferiblemente la versión L12534.1). Las enzimas para usar en la presente invención están disponibles a través de fuentes comerciales, por ejemplo Sigma Aldrich.

30 Por "degradar" o "enzima de degradación" se entiende una enzima que es capaz de descomponer una proteína o carbohidrato. Una proteína se puede dividir en secuencias peptídicas o aminoácidos, por ejemplo por hidrólisis del enlace peptídico. Un carbohidrato puede descomponerse en oligosacáridos o unidades de azúcar individuales. Una proteína y/o carbohidrato puede degradarse total o parcialmente, lo que significa que una parte de ella puede descomponerse en fragmentos más pequeños, mientras que el resto de la proteína y/o carbohidrato puede estar en su forma nativa.

35 Preferiblemente, una proteína o carbohidrato de matriz extracelular degradada pierde cierta capacidad para proporcionar soporte estructural y/o bioquímico a una célula, de modo que una secuencia de ácido nucleico introducida en el vítreo puede acceder mejor a una célula retinal. En particular, una proteína de la matriz extracelular degradada pierde parte o la totalidad de su capacidad para impedir el movimiento de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, un vector de suministro de genes, tal como un vector viral), dentro del vítreo y dentro y a través de la retina. Cualquier pérdida en la función de la matriz extracelular es suficientemente mínima para que no tenga ningún efecto adverso significativo en el ojo o la visión.

40 En este documento, la referencia a una enzima de degradación de la matriz extracelular incluye fragmentos activos de la misma. Un fragmento activo puede ser una porción o una versión más corta de la enzima nativa, que conserva la capacidad de funcionar como una enzima de degradación de la matriz extracelular, es decir, conserva la capacidad de degradar una proteína o carbohidrato de la matriz extracelular, tal como se define en el presente documento. Un fragmento activo puede comprender el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la secuencia de la enzima nativa.

45 En este documento, la referencia a una enzima incluye una o más enzimas. Por lo tanto, la invención proporciona la administración conjunta de una sola enzima o una combinación de dos o más enzimas. Preferiblemente, cuando se proporcionan dos o más enzimas, cada una se selecciona del grupo definido anteriormente. Cuando se administran dos o más enzimas, se pueden proporcionar por separado, secuencialmente, o se pueden proporcionar dos o más en combinación. Preferiblemente, se administran dos enzimas en combinación. Cuando se proporcionan dos o más dosis separadas de enzima, se puede proporcionar una o más de estas en combinación con la secuencia de ácido nucleico.

50 Una enzima para usar como se describe en el presente documento puede derivarse de cualquier fuente adecuada. La fuente puede ser de mamífero o no mamífero. Puede derivarse de una fuente animal, vegetal, bacteriana o arqueobacteriana. Cuando es mamífero, se prefiere que sea una enzima humana. Puede aislarse o purificarse de tal fuente. Se puede producir como una proteína recombinante. Alternativamente, se puede producir sintéticamente.

Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de enzimas para su uso como se describe en el presente documento son conocidas en la técnica.

55 En este documento, las enzimas incluyen fragmentos y derivados de enzimas nativas. Preferiblemente, un fragmento o derivado comparte al menos 70%, 75%, 80%, 85% o 90%, al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o al menos 99% de identidad de secuencia con una enzima nativa, en una longitud del 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos el 95% de la longitud de una enzima nativa.

La identidad de secuencia se determina comparando las dos secuencias alineadas en una ventana de comparación predeterminada (que puede ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% de la longitud de la secuencia del nucleótido o proteína de referencia), y determinar el número de posiciones en las que se producen residuos idénticos. Típicamente, esto se expresa como un porcentaje. La medición de la identidad de secuencia de una secuencia de nucleótidos es un método bien conocido por los expertos en la técnica, que utiliza algoritmos matemáticos implementados por ordenador tal como ALIGN (versión 2.0), GAP, BESTFIT, BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990)), FASTA y TFASTA (Paquete de software genético de Wisconsin versión 8, disponible de Genetics Computer Group, Accelrys Inc. San Diego, California) y CLUSTAL (Higgins et al, Gene 73: 237-244 (1998)), utilizando parámetros predeterminados.

Una enzima para uso como se describe en el presente documento puede proporcionarse en forma seca, que incluye formas deshidratadas o liofilizadas. Típicamente, se proporcionará una enzima en forma liofilizada. Alternativamente, se puede proporcionar una enzima como una solución acuosa, por ejemplo disuelta previamente en agua a una concentración y volumen predeterminados. Para la administración, se prefiere una forma acuosa, aunque se prevé que un producto o kit de la invención pueda adaptarse a la provisión de una forma seca de la enzima, opcionalmente con instrucciones para la disolución. Por lo tanto, un método de administración conjunta de una enzima como se describe en el presente documento puede comprender el uso de una enzima seca para producir una solución enzimática. Preferiblemente, esto se logra disolviendo o reconstituyendo la enzima en un disolvente acuoso o no acuoso. Los disolventes adecuados son aquellos que no son tóxicos y adecuados para su uso con humanos o animales. Preferiblemente, un disolvente adecuado es estéril. Un ejemplo de un disolvente adecuado es la solución salina tamponada con fosfato estéril. Los métodos para disolver proteínas secas son conocidos en la técnica.

La presente invención proporciona una composición terapéutica para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina, en la que la composición terapéutica comprende un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana, en la que el vector comprende un promotor unido operativamente al ácido nucleico en el que el promotor dirige la expresión ubicua o específica de neurona en las células retinales internas, en el que las células retinales internas comprenden células bipolares de ENCENDIDO o células bipolares de APAGADO. La invención permite la restauración de la capacidad fotorreceptiva de la retina. Una proteína fotosensible es aquella que reacciona a la luz, experimentando un cambio químico o físico. Por fotorreceptiva, se entiende una célula que es fotosensible o que comprende una proteína fotosensible. Los términos fotorreceptiva o fotorreceptor y fotosensible pueden usarse indistintamente.

Una secuencia de ácido nucleico como se describe en el presente documento puede codificar cualquier proteína fotosensible. Preferiblemente, una secuencia de ácido nucleico como se describe en este documento codifica una proteína fotosensible de mamífero o no mamífero. Puede ser de origen mamífero, no mamífero, vegetal, bacteriano o arqueobacteriano. Cuando es mamífero, se prefiere que codifique una proteína humana. Una secuencia de ácido nucleico para su uso como se describe en el presente documento puede seleccionarse del grupo que consiste en rodopsina, melanopsina, una opsina de cono (en particular, opsina LWS, opsina MW y opsina SWS), neuropsina (Opn5), encefalopsina (Opn3), una opsina parapineal, VAopsina, parapinopsina, parietopsina, pinopsina, opsina TMT, opsina de medusa, opsina C, criptocromo y cualquier opsina retinal de invertebrado y/u opsinas que normalmente soportan fotosensibilidad extraretinal en animales.

Se puede seleccionar una secuencia de ácido nucleico como se describe en el presente documento dependiendo del sujeto a tratar, de modo que la secuencia de ácido nucleico codifica una proteína fotosensible que es nativa de la retina del sujeto a tratar. Así, por ejemplo, cuando el sujeto es un ser humano, una secuencia de ácido nucleico codificará preferiblemente una proteína fotosensible humana, por ejemplo rodopsina. Sin embargo, se prevé que en ciertas realizaciones, se pueda proporcionar una secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína fotosensible que no sea nativa del sujeto a tratar, pero que preferiblemente no genere una respuesta inmune en el sujeto.

Las secuencias de ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos de muchas proteínas fotosensibles son conocidas en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico de proteínas fotosensibles preferidas se proporcionan como sigue:

Melanopsina: opsina 4 de Homo sapiens (OPN4), ARNm (clon de ADNc MGC: 142118 IMAGE: 8322610), GenBank: BC113558, versión BC113558.1;

Rodopsina: rodopsina de Homo sapiens (RHO), GenBank: BC111451.3, acceso NM_000539, versión NM_000539.3 GI: 169808383;

Opsin 1 de cono de Homo sapiens: Opsina 1 de Homo sapiens, sensible a ondas largas, OPN1LW - Secuencia de referencia NCBI: acceso: NM_020061, versión NM_020061.5;

Opsina 1 de Homo sapiens, sensible a longitud de onda media OPN1MW - NM_000513, versión NM_000513.2;

Opsina 1 de Homo sapiens, sensible a longitud de onda corta (OPN1SW) NM_001708, versión NM_001708.2.

Parapinopsina (GenBank acceso NM_001200073, versión NM_001200073.1 GI: 318056020);

Parietopsina (GenBank acceso DQ100320, versión DQ100320.1 GI: 73666459); Pinopsina (GenBank acceso AF487546,

- versión AF487546.1 GI: 20805654);
- Opsina VA (GenBank acceso AF233520, versión AF233520.1 GI: 8272567);
- TMT opsin (GenBank accesos AH011520, AF349943, AF349944, AF349945, versión AH011520.2 GI: 339511123);
- Opsina de medusa (GenBank acceso AB435549, versión AB435549.1 GI: 210049957);
- 5 OPN3 (GenBank acceso NM_014322, versión NM_014322.2 GI: 71999130);
- OPN5 (GenBank acceso AY377391, versión AY377391.1 GI: 38482095);
- Opsina C (GenBank acceso HF566407, versión HF566407.1 GI: 543581059); y
- Cripcromomo (GenBank acceso NM_169852, versión NM_169852.1 GI: 24648151).
- 10 En la presente invención, la proteína fotorreceptora es una proteína fotorreceptora humana. Una proteína fotorreceptora humana puede ser Rodopsina humana (también conocida como Rh1, OPN2, RHO) o una fotopsina. Se puede seleccionar una fotopsina del grupo que consiste en opsina sensible a la longitud de onda larga (OPN1LW), opsina sensible a la longitud de onda media (OPN1MW) y opsina sensible a la longitud de onda corta (OPN1SW).
- 15 La opsina sensible a la longitud de onda larga (OPN1LW) tiene un $\lambda_{\text{máx}}$ de 560 nm, en la región amarillo-verde del espectro electromagnético. También se conoce como una "opsina roja", "opsina L" u "opsina LWS". La opsina sensible a la longitud de onda media (OPN1MW) tiene un $\lambda_{\text{máx}}$ de 530 nm, en la región verde del espectro electromagnético. También se conoce como "opsina verde", "opsina M" u "opsina MWS". La opsina sensible a la longitud de onda corta (OPN1SW) tiene un $\lambda_{\text{máx}}$ de 430 nm, en la región azul del espectro electromagnético. También se conoce como "opsina azul", "opsina S" u "opsina SWS".
- 20 La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana puede ser el gen de la rodopsina de Homo sapiens (RHO) (GenBank: BC111451.3, acceso NM_000539, versión NM_000539.3 GI: 169808383), o un fragmento o derivado de la misma.
- La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana puede ser la opsina 1 de conos de Homo sapiens , OPN1LW sensible a la onda larga (Secuencia de referencia del NCBI: acceso: NM_020061, versión NM_020061.5), o un fragmento o derivado de la misma.
- 25 La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana puede ser la opsina 1 de conos de Homo sapiens : sensible a la onda media OPN1MW, (Secuencia de referencia del NCBI: acceso: NM_000513.2; (Science 232 (4747), 193-202 (1986))), o un fragmento o derivado del mismo.
- La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana puede ser la opsina 1 de conos de Homo sapiens: sensible a onda corta (OPN1SW) NM_001708, versión NM_001708.2, o un fragmento o derivado de la misma.
- 30 La referencia a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible incluye secuencias de ácido nucleico que son derivados de las secuencias descritas en el presente documento, o codifican una versión más corta, o un fragmento de una proteína fotosensible, en la que el derivado o fragmento retiene sustancialmente la misma función fotosensible que la proteína fotosensible nativa. Por sustancialmente la misma se entiende al menos el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la función fotosensible de la proteína nativa. Un fragmento puede comprender
- 35 el 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de la secuencia de la proteína nativa.
- Preferiblemente, un fragmento o derivado de una secuencia de ácido nucleico comparte al menos 70%, 75%, 80%, 85% o 90%, al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o al menos 99% de identidad de secuencia con una secuencia de ácido nucleico de referencia, en una longitud de 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o al menos 95% de la longitud de una secuencia de ácido nucleico de referencia. Un derivado es preferiblemente activo, y puede incluir sustituciones y/o eliminaciones y/o
- 40 adiciones en comparación con la secuencia nativa. Los derivados también pueden incluir porciones de otras secuencias de genes, que proporcionan una actividad o función deseada a la proteína fotosensible.
- La identidad de secuencia se determina comparando las dos secuencias alineadas en una ventana de comparación predeterminada (que puede ser 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% de la longitud de la secuencia del nucleótido de referencia o proteína), y determinar el número de posiciones en las que se producen residuos idénticos. Típicamente,
- 45 esto se expresa como un porcentaje. La medición de la identidad de secuencia de una secuencia de nucleótidos es un método bien conocido por los expertos en la técnica, que utiliza algoritmos matemáticos implementados por ordenador tales como ALIGN (versión 2.0), GAP, BESTFIT, BLAST (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403 (1990)), FASTA y TFASTA (Paquete de software genético de Wisconsin versión 8, disponible a través de Genetics Computer Group, Accelrys Inc. San Diego, California) y CLUSTAL (Higgins et al., Gene 73: 237-244 (1998)) , utilizando los parámetros predeterminados.
- 50 Una secuencia de ácido nucleico puede ser un ADN, ARN, ADNc o PNA. Puede ser genómica, recombinante o sintética. Una secuencia de ácido nucleico puede aislarse o purificarse. Puede ser de cadena sencilla o cadena doble. Preferiblemente, una secuencia de ácido nucleico codificará una proteína fotosensible, como se describe en el presente

documento. Una secuencia de ácido nucleico se puede derivar por clonación, por ejemplo usando técnicas de clonación molecular estándar que incluyen digestión de restricción, ligación, electroforesis en gel, por ejemplo como se describe en Sambrook et al; Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Una secuencia de ácido nucleico se puede aislar, por ejemplo usando tecnología de PCR. Dicha tecnología puede emplear cebadores basados en la secuencia de la secuencia de ácido nucleico que se va a amplificar. Por aislado se entiende que la secuencia de ácido nucleico se separa de cualquier impureza y de otras secuencias de ácido nucleico y/o proteínas que se encuentran naturalmente asociadas con la secuencia de ácido nucleico en su fuente. Por lo tanto, se puede separar de secuencias de ácido nucleico flanqueantes, o de material o secuencia cromosómica. Preferiblemente, también estará libre de material celular, medio de cultivo u otros productos químicos de un proceso de purificación/producción. Una secuencia de ácido nucleico puede ser sintética, por ejemplo producida mediante síntesis química directa, por ejemplo, utilizando el método de fosfotriéster (Narang et al., Meth Enzymol 68: 109-151, 1979). Se puede proporcionar una secuencia de ácido nucleico como ácido nucleico desnudo, o se puede proporcionar complejada con una proteína o lípido.

La secuencia puede alterarse para mejorar la eficacia de la expresión (por ejemplo, mediante truncamiento del terminal C o introduciendo motivos de direccionamiento), o para alterar las características de la respuesta a la luz (por ejemplo, eliminando o añadiendo residuos dirigidos por rodopsina quinasas como parte del proceso de terminación de señal).

Con la información de secuencia proporcionada, la persona experta puede usar las técnicas de clonación disponibles para producir una secuencia de ácido nucleico o un vector adecuado para la transducción en una célula.

Preferiblemente, se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible como un vector, preferiblemente un vector de expresión. Preferiblemente, puede proporcionarse como un vector de terapia génica, preferiblemente que sea adecuado para la transducción y expresión en una célula retinal objetivo. Un vector puede ser viral o no viral (por ejemplo, un plásmido). Los vectores virales incluyen los derivados de adenovirus, virus adenoasociados (AAV) que incluyen formas mutadas, retrovirus, lentivirus, virus del herpes, virus vacuna, MMLV, GaLV, virus de inmunodeficiencia simia (SIV), VIH, virus de la viruela y SV40. Un vector viral tiene preferiblemente una replicación defectuosa, aunque se prevé que pueda ser deficiente en replicación, replicación competente o condicional. Un vector viral generalmente puede persistir en un estado extracromosómico sin integrarse en el genoma de la célula retinal objetivo. Un vector viral preferido para la introducción de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible a una célula objetivo retinal es un vector AAV, por ejemplo, un virus adenoasociado autocomplementario (scAAV). El direccionamiento selectivo puede lograrse utilizando un serotipo AAV específico (serotipo 2 de AAV a serotipo 12 de AAV) o una versión modificada de cualquiera de estos serotipos, incluidos los vectores 4YF de AAV y 7m8 de AAV. En aspectos de la invención en los que el vector se proporciona por administración intravítrea, el vector puede ser uno que se haya modificado de modo que no se una a una o más proteínas de la ECM. Por ejemplo, un vector preferido puede comprender un sitio de unión a sulfato de heparina modificado, de modo que se haya reducido o sea incapaz de unirse al sulfato de heparina, tal como 7m8 de AAV (Dalkara D et al., Sci Transl Med 2013; 5: 189ra76).

Se puede modificar un vector viral para eliminar cualquier secuencia no esencial. Por ejemplo, en AAV, el virus puede modificarse para eliminar todo o parte del gen IX, el gen E1a y/o E1b. Para el AAV de tipo silvestre, la replicación tiene una eficacia extremadamente baja, sin la presencia de virus auxiliares, tal como el adenovirus. Para el virus adenoasociado recombinante, preferiblemente los genes de replicación y cápside se proporcionan en trans (en el plásmido pRep/Cap), y solamente quedan las 2 ITR del genoma de AAV y se empaquetan en un virión, mientras que los genes de adenovirus requeridos se proporcionan por adenovirus u otro plásmido. Se pueden hacer modificaciones similares a un vector lentiviral.

Un vector viral tiene la capacidad de entrar en una célula. Sin embargo, un vector no viral tal como el plásmido puede complejarse con un agente para facilitar su captación por una célula objetivo. Dichos agentes incluyen agentes policatiónicos. Alternativamente, se puede usar un sistema de administración tal como un sistema de administración basado en liposomas.

Un vector para usar en la presente invención es preferiblemente adecuado para usar *in vivo* o *in vitro*, y es preferiblemente adecuado para usar en un ser humano.

Un vector comprenderá preferiblemente una o más secuencias reguladoras para dirigir la expresión de la secuencia de ácido nucleico en una célula retinal objetivo. Una secuencia reguladora puede incluir un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico, un potenciador, una señal de terminación de la transcripción, una secuencia de poliadenilación, un origen de replicación, un sitio de restricción de ácido nucleico y un sitio de recombinación homóloga. Un vector también puede incluir un marcador seleccionable, por ejemplo para determinar la expresión del vector en un sistema de crecimiento (por ejemplo, una célula bacteriana) o en una célula retinal objetivo.

Por "unida operativamente" significa que la secuencia de ácido nucleico está funcionalmente asociada con la secuencia a la que está unido operativamente, de modo que están unidos de tal manera que afectan la expresión o función de los demás. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico unida operativamente a un promotor tendrá un patrón de expresión influenciado por el promotor.

Un promotor media la expresión de la secuencia de ácido nucleico a la que está unida. Un promotor puede ser constitutivo o puede ser inducible. Un promotor puede dirigir la expresión ubicua en las células retinales internas, o la expresión

específica de neurona. En el último caso, un promotor puede dirigir la expresión específica del tipo de célula, por ejemplo a células bipolares de ENCENDIDO o células bipolares de APAGADO. Los promotores adecuados serán conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede seleccionar un promotor adecuado del grupo que consiste en L7, thy-1, recoverina, calbindina, CMV humano, GAD-67, beta-actina de pollo, hSyn, Grm6, proteína de fusión potenciador de Grm6-SV40. La direccionamiento se puede lograr usando promotores específicos de células, por ejemplo, Grm6-SV40 para el direccionamiento selectivo de células bipolares de ENCENDIDO. El promotor Grm6 es una fusión de la secuencia potenciadora de 200 pares de bases del gen Grm6 que codifica para el receptor de glutamato metabotrópico específico de células bipolares de ENCENDIDO, mGluR6 y un promotor eucariota SV40. Las fuentes preferidas del gen Grm6 son ratón y humano. La expresión ubicua se puede lograr usando un promotor pan neuronal, cuyos ejemplos son conocidos y están disponibles en la técnica. Un ejemplo de ello es CAG. El promotor CAG es una fusión de potenciador temprano de CMV y promotor de β -actina de pollo.

En el presente documento también se describe una composición terapéutica que comprende i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible y ii) una enzima de degradación de la matriz extracelular. Se puede proporcionar una composición en un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Como se describió anteriormente, la presente invención proporciona una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina, que comprende un vector de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana. La proteína fotorreceptora humana puede ser Rodopsina humana (también denominada Rh1, OPN2, RHO) o una fotopsina. Se puede seleccionar una fotopsina del grupo que consiste en opsina sensible a la longitud de onda larga (OPN1LW), opsina sensible a la longitud de onda media (OPN1MW) y opsina sensible a la longitud de onda corta (OPN1SW). El vector puede proporcionarse como una composición, para la administración a un sujeto.

Una composición puede ser un líquido o un sólido, por ejemplo, un polvo, gel o pasta. Preferiblemente, una composición es un líquido, preferiblemente un líquido inyectable. Los excipientes adecuados serán conocidos por los expertos en la materia.

El vector puede administrarse a un ojo mediante administración subretinal o intravítrea. En cualquier modo de administración, el vector se proporciona preferiblemente como un líquido inyectable. Preferiblemente, el líquido inyectable se proporciona como una cápsula o jeringa. En este aspecto, preferiblemente el ácido nucleico se introduce sin la administración de una enzima de degradación de la matriz extracelular (es decir, se introduce sin la administración conjunta de una enzima, en la que la administración conjunta incluye administración separada, secuencial o combinada durante la misma terapia) como se define en el presente documento. En este aspecto, preferiblemente el líquido inyectable no comprende una enzima de degradación de la matriz extracelular.

Se puede proporcionar una enzima por separado o en combinación con la secuencia de ácido nucleico, es decir, como una composición única. Cuando se proporciona por separado, la secuencia de enzima y ácido nucleico se puede proporcionar en el mismo excipiente o en diferentes excipientes. En tal realización, se puede mantener por separado, por ejemplo en microcápsulas separadas. Por lo tanto, en el presente documento se describe una composición que comprende i) un primer líquido inyectable que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible; y ii) un segundo líquido inyectable que comprende una enzima de degradación de la matriz extracelular. Preferiblemente, los líquidos inyectables primero y segundo se proporcionan en recipientes separados, tales como cápsulas o jeringas, preferiblemente dentro del mismo empaque.

Preferiblemente, se proporciona una composición terapéutica del primer aspecto de la invención para la administración separada, secuencial o combinada del ácido nucleico y la enzima a un sujeto.

Se puede describir una composición terapéutica de la invención para usar en un método para proporcionar la función fotorreceptora a una célula. En una realización, la composición de la invención puede proporcionarse para su uso en un método para restaurar la función fotorreceptora de una retina. En una realización, se puede proporcionar una composición de la invención para usar en un método de restaurar la visión a un sujeto. En una realización, la condición degenerativa de la retina puede incluir, por ejemplo, una distrofia retinal que incluye una distrofia de bastones, una distrofia de bastones-conos, una distrofia de cono-bastones, una distrofia de conos y una distrofia macular; otras formas de degeneración retinal o macular, una condición isquémica, uveítis y cualquier otra enfermedad resultante de la pérdida de la capacidad de los fotorreceptores, por ejemplo, pigmentosa retinal.

La presente invención proporciona un kit que comprende una composición terapéutica de la invención. La proteína fotorreceptora humana puede ser como se describió anteriormente. El vector de ácido nucleico puede proporcionarse como una composición, como se describe en el presente documento. La composición puede ser un líquido inyectable. En este aspecto, preferiblemente el kit no comprende una enzima de degradación de la matriz extracelular.

También se describe en el presente documento un kit que comprende i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible; y ii) una enzima de degradación de la matriz extracelular. En el kit de la invención, la enzima de degradación de la matriz extracelular y la secuencia de ácido nucleico se pueden proporcionar por separado o en combinación. Cada uno de ellos, independientemente, puede proporcionarse como una composición, por ejemplo, como se describe en el presente documento. Por lo tanto, un kit descrito en el presente documento puede comprender i) una

5 secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible y ii) una enzima de degradación de la matriz extracelular, en la que la secuencia de ácido nucleico y/o la enzima se proporcionan como una composición. La secuencia de ácido nucleico y la enzima pueden proporcionarse en combinación, en una única composición, o pueden proporcionarse como composiciones separadas. Cuando se proporciona por separado, la enzima y la secuencia de ácido nucleico se puede proporcionar en el mismo excipiente o en diferentes excipientes. En tal realización, se puede mantener por separado, por ejemplo en microcápsulas separadas.

10 Un kit puede comprender i) un primer líquido inyectable que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible y ii) un segundo líquido inyectable que comprende una enzima de degradación de la matriz extracelular. Preferiblemente, los líquidos inyectables primero y segundo se proporcionan en recipientes separados, tales como cápsulas o jeringas, preferiblemente dentro del mismo empaque.

Un kit de la invención puede comprender además instrucciones de uso, un régimen de dosificación, una o más agujas finas, una o más jeringas y disolvente.

15 Se puede proporcionar un kit de la invención para usar en un método para proporcionar la función fotorreceptora a una célula. En una realización, se puede proporcionar un kit de la invención para su uso en un método para restaurar la función fotorreceptora de una retina. En una realización, se puede proporcionar un kit de la invención para usar en un método para restablecer la visión a un sujeto. En una realización, se puede proporcionar un kit de la invención para usar en un método de tratamiento de una condición degenerativa de la retina, por ejemplo, una distrofia retinal que incluye una distrofia de bastones, una distrofia de bastones-conos, una distrofia de conos-bastones, una distrofia de conos y una distrofia macular; otras formas de degeneración retinal o macular, una condición isquémica, uveítis y cualquier otra enfermedad resultante de la pérdida de la capacidad de fotorreceptor.

20 En el presente documento se describe un método para proporcionar la función fotorreceptora a una célula, el comprendiendo el método introducir en un ojo un vector de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana. La proteína fotorreceptora humana puede ser como se describió anteriormente. El método puede comprender la administración subretinal o intravítrea del vector de ácido nucleico a las células retinales internas del ojo. En este aspecto, preferiblemente el método no comprende la administración de una enzima de degradación de la matriz extracelular. La presente invención proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana para su uso en un método de tratamiento de la degeneración de la retina proporcionando la función fotorreceptora a una célula. En este aspecto, preferiblemente no se usa una enzima de degradación de la matriz extracelular (es decir, el ácido nucleico se introduce sin la administración conjunta de una enzima, en la que la administración conjunta incluye la administración separada, secuencial o combinada durante la misma terapia).

25 En este documento se describe un método para proporcionar la función fotorreceptora a una célula, comprendiendo el método introducir en la cavidad vítrea de un ojo i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible y ii) una enzima de degradación de la matriz extracelular. La presente invención proporciona i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible y ii) una enzima de degradación de la matriz extracelular para usar en un método para proporcionar la función fotorreceptora a una célula.

30 Una composición terapéutica de la invención se puede usar en un método para aumentar la función fotorreceptora en una retina, en particular después de la degeneración de los bastones y/o conos, comprendiendo el método introducir en la cavidad vítrea de un ojo un vector de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana. La proteína fotorreceptora humana puede ser como se describió anteriormente. El método puede comprender la administración subretinal o intravítrea del vector de ácido nucleico a las células retinales internas del ojo. En este aspecto, preferiblemente el método no comprende la administración de una enzima de degradación de la matriz extracelular. La presente invención proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana para su uso en el tratamiento de la degeneración de la retina aumentando la función fotorreceptora en una retina. La proteína fotorreceptora humana puede ser como se describió anteriormente. En este aspecto, preferiblemente no se usa una enzima de degradación de la matriz extracelular (es decir, el ácido nucleico se introduce sin la administración conjunta de una enzima, en la que la administración conjunta incluye la administración separada, secuencial o combinada durante la misma terapia).

35 También se describe en el presente documento un método para aumentar la función fotorreceptora en una retina, en particular después de la degeneración del bastón y/o cono, comprendiendo el método proporcionar la función fotorreceptora a una célula como se describe en el presente documento. La presente invención proporciona i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible y ii) una enzima de degradación de la matriz extracelular para su uso en un método para aumentar la función fotorreceptora en una retina, en particular después de la degeneración del bastón y/o cono, en el que el método comprende proporcionar función fotorreceptora a una célula como se describe en el presente documento.

40 También se describe i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible y ii) una enzima de degradación de la matriz extracelular para usar en un método para restaurar la visión de un sujeto, en el que el método comprende proporcionar la función fotorreceptora a una célula como se describe en el presente documento.

La presente invención proporciona una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina, en la que la composición terapéutica comprende un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana, en donde el vector comprende un promotor unido operativamente al ácido nucleico en el que el promotor dirige la expresión ubicua o específica de neurona en las células retinales internas, en el que las células retinales internas comprenden células bipolares de ENCENDIDO o células bipolares de APAGADO. La proteína fotorreceptora humana puede ser como se describió anteriormente. El método puede comprender la administración subretinal o intravítrea del vector de ácido nucleico a las células retinales internas del ojo. En este aspecto, preferiblemente el método no comprende la administración de una enzima de degradación de la matriz extracelular. La presente invención proporciona un vector de ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana para su uso en el tratamiento de una enfermedad de la retina en un sujeto. La proteína fotorreceptora humana puede ser como se describió anteriormente. En este aspecto, preferiblemente no se usa una enzima de degradación de la matriz extracelular (es decir, el ácido nucleico se introduce sin la administración conjunta de una enzima, en donde la administración conjunta incluye la administración separada, secuencial o combinada durante la misma terapia). La enfermedad puede ser una distrofia retinal que incluye una distrofia de bastones, una distrofia de bastones y conos, una distrofia de conos y bastones, una distrofia de conos y una distrofia macular; otras formas de degeneración retinal o macular, una condición isquémica, uveítis y cualquier otra enfermedad resultante de la pérdida de la capacidad de los fotorreceptores. El método de tratamiento puede comprender restaurar la visión de un sujeto.

También se describe en el presente documento un método para tratar una enfermedad degenerativa de la retina, comprendiendo el método proporcionar una función fotorreceptora a una célula como se describe en el presente documento. Por lo tanto, se describe en el presente documento i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible y ii) una enzima de degradación de la matriz extracelular para usar en un método de tratamiento de una enfermedad, como se define en el presente documento. La enfermedad puede ser una distrofia retinal que incluye una distrofia de bastones, una distrofia de bastones y conos, una distrofia de conos y bastones, una distrofia de conos y una distrofia macular; otras formas de degeneración retinal o macular, una condición isquémica, uveítis y cualquier otra enfermedad resultante de la pérdida de la capacidad de los fotorreceptores.

Proporcionar una función fotorreceptora a una célula significa que una célula que previamente no tenía capacidad fotorreceptora o cuya capacidad fotorreceptora se ha degenerado, total o parcialmente, se vuelve fotorreceptora tras la expresión en la misma de una secuencia de ácido nucleico foráneo que codifica una proteína fotosensible. Dicha célula puede denominarse en este documento como una célula transformada, porque comprende en ella ácido nucleico no nativo. Preferiblemente, una célula retinal transformada exhibe parte o la totalidad de la capacidad fotorreceptora de una célula fotorreceptiva nativa. Preferiblemente, una célula transformada exhibe al menos la misma o sustancialmente la misma capacidad fotorreceptora de una célula fotorreceptora retinal nativa. Preferiblemente, una célula transformada exhibe una mayor capacidad fotorreceptora que una célula fotorreceptora de la retina nativa enferma o degenerada. Por lo tanto, una célula transformada tendrá preferiblemente una mayor capacidad fotorreceptora en comparación con una célula degenerada o enferma de la misma fuente, mantenida en las mismas condiciones, sin tratamiento. Una célula transformada se puede distinguir de una célula nativa por la presencia en ella de ácido nucleico exógeno.

Aumentar la función fotorreceptora significa aumentar la función fotorreceptora de la retina, ya sea aumentando la función en las células fotorreceptoras tales como los bastones o conos, y/o proporcionando la función fotorreceptora a una célula. Por lo tanto, la retina tendrá una mayor capacidad para recibir señales de luz y transmitir tales señales en comparación con una retina que no ha sido tratada con el método como se describe en el presente documento. El aumento puede ser en cualquier cantidad, preferiblemente a niveles de tipo silvestre.

Restaurar la visión en un sujeto significa que el sujeto muestra una visión mejorada en comparación con antes del tratamiento, por ejemplo, usando pruebas de visión como se describe en el presente documento. La restauración incluye cualquier grado de mejora, incluida la restauración completa de la visión para una visión perfecta o casi perfecta.

Por tratamiento de la enfermedad se entiende la administración de ácido nucleico y enzima de degradación extracelular como se describe en el presente documento para mejorar o aliviar uno o más síntomas de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una distrofia retinal que incluye una distrofia de bastones, una distrofia de bastones y conos, una distrofia de conos y bastones, una distrofia de conos y una distrofia macular; otras formas de degeneración retinal o macular, condiciones isquémicas, uveítis y cualquier otra enfermedad resultante de la pérdida de la capacidad de los fotorreceptores. La mejora o el alivio pueden resultar en una mejora de la visión periférica o central, y/o la visión diurna o nocturna.

La invención comprende introducir en la cavidad vítrea de un ojo una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible. Preferiblemente, comprendiendo el método poner en contacto una célula con una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible. Preferiblemente, una célula es una célula retinal, preferiblemente una célula bipolar ENCENDIDA, una célula bipolar APAGADA, una célula horizontal, una célula ganglionar y/o una célula amacrina.

Preferiblemente, un método como se describe en el presente documento comprende dirigir una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible a la retina de un ojo, preferiblemente a una célula no fotorreceptiva de la retina, preferiblemente a una célula bipolar ENCENDIDA, una célula bipolar APAGADA, una célula horizontal, una célula

ganglionar y/o una célula amacrina. Por lo tanto, poner en contacto una célula incluye la transfección y/o la transducción de una célula.

5 Cuando se administra una enzima, la enzima no necesita ser internalizada en una célula retinal, sino que puede permanecer en la cavidad vítrea o en la retina, donde degrada las proteínas de la matriz extracelular para mejorar el acceso de la secuencia de ácido nucleico a la células de la retina.

Un método de tratamiento se realiza preferiblemente *in vivo*.

10 La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible y una enzima se puede proporcionar por separado o secuencialmente o en combinación. Cuando se proporciona simultáneamente (es decir, en combinación), se puede proporcionar una secuencia de ácido nucleico y una enzima como una sola composición que se introduce en la cavidad vítrea, o se puede proporcionar como composiciones separadas pero se proporciona a la cavidad vítrea simultáneamente. Si se proporciona por separado, una secuencia de ácido nucleico y una enzima pueden proporcionarse en composiciones separadas, y pueden proporcionarse al mismo tiempo o secuencialmente. Cuando se proporciona secuencialmente, se puede proporcionar una enzima antes o después de una secuencia de ácido nucleico, preferiblemente antes. En la invención, una enzima no se administra conjuntamente por los métodos descritos anteriormente.

15 Cuando se proporcionan dos o más enzimas, se pueden introducir en una dosis única combinada o en dosis múltiples. Se puede proporcionar una dosis de enzima en combinación con una secuencia de ácido nucleico, o por separado a la misma. Cuando se introducen múltiples dosis de enzimas, una o más dosis pueden ser una dosis combinada de enzima/ácido nucleico. Un método preferido comprende la introducción de i) una dosis combinada de enzima, y ii) una dosis secuencial de secuencia de ácido nucleico. En un método preferido, la dosis de enzima comprende heparinasa III y hialuronano liasa.

20 Se puede usar cualquier método adecuado para introducir una secuencia de ácido nucleico y una enzima en la subretina o la cavidad vítrea. Un método preferido es la inyección. Por lo tanto, se puede proporcionar una dosis de secuencia de ácido nucleico y/o enzima como una inyección. Un método de la invención puede comprender inyectar subretinalmente o en la cavidad vítrea un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana. Preferiblemente, el método es proporcionar una función fotorreceptora a una célula, por ejemplo, para restaurar la visión, preferiblemente para el tratamiento de una condición degenerativa de la retina, por ejemplo, una distrofia retinal que incluye una distrofia de bastones, una distrofia de bastones y conos, una distrofia de conos y bastones, una distrofia de conos y una distrofia macular; otras formas de degeneración retinal o macular, condiciones isquémicas, uveítis y cualquier otra enfermedad resultante de la pérdida de la capacidad de los fotorreceptores.

30 Un método puede comprender inyectar en la cavidad vítrea, por separado, simultánea o secuencialmente, i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible y ii) una enzima de degradación de la matriz extracelular. En un método preferido, un método comprende inyectar una dosis única que comprende una i) secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible y ii) una enzima de degradación de la matriz extracelular en la cavidad vítrea de un ojo. Preferiblemente, un método comprende inyectar una dosis única que comprende i) una secuencia de ácido nucleico que codifica rodopsina; y ii) las enzimas heparinasa III y hialuronano liasa, en la cavidad vítrea de un ojo. En un método preferido, se puede proporcionar una dosis inyectable única que comprende i) una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible y ii) una enzima de degradación de la matriz extracelular para la introducción en la cavidad vítrea de un ojo para proporcionar una función fotorreceptora a una célula, por ejemplo, para restaurar la visión, preferiblemente para el tratamiento de una condición degenerativa de la retina, por ejemplo, una distrofia retinal que incluye una distrofia de bastones, una distrofia de bastones y conos, una distrofia de conos y bastones, una distrofia de conos y una distrofia macular; otras formas de degeneración retinal o macular, condiciones isquémicas, uveítis y cualquier otra enfermedad resultante de la pérdida de la capacidad de los fotorreceptores. Preferiblemente, se proporciona una dosis inyectable única que comprende i) una secuencia de ácido nucleico que codifica rodopsina; y ii) las enzimas heparinasa III y hialuronano liasa, para la introducción en la cavidad vítrea de un ojo para proporcionar una función fotorreceptora a una célula, por ejemplo, para restaurar la visión, preferiblemente para el tratamiento de una condición degenerativa de la retina, por ejemplo, una distrofia retinal que incluye una distrofia de bastones, una distrofia de bastones y conos, una distrofia de conos y bastones, una distrofia de conos y una distrofia macular; otras formas de degeneración retinal o macular, una condición isquémica, uveítis y cualquier otra enfermedad resultante de la pérdida de la capacidad de los fotorreceptores.

45 Cuando se proporciona una secuencia de ácido nucleico y una o más enzimas en múltiples (dos o más) dosis, estas se pueden separar por intervalos de tiempo adecuados, por ejemplo de 30 segundos a varias horas o 1 o más días.

50 Cada dosis puede comprender una cantidad efectiva de una secuencia de ácido nucleico y/o una enzima. Una dosis efectiva de una secuencia de ácido nucleico puede variar de 1×10^9 a 1×10^{14} o $7,5 \times 10^{15}$, preferiblemente 1×10^{11} a $7,5 \times 10^{13}$ secuencias de ácido nucleico por régimen de tratamiento (por ejemplo, número de vectores o partículas de virus). Se puede proporcionar una enzima a una dosis de 0,075 – 0,125 unidades por ojo, o más.

De acuerdo con la invención, un sujeto puede ser diagnosticado por primera vez por una condición degenerativa de la retina, por ejemplo, una distrofia retinal que incluye una distrofia de bastones, una distrofia de bastones y conos, una distrofia de conos y bastones, una distrofia de conos, una distrofia macular; otras formas de degeneración retinal o

macular, condiciones isquémicas, uveítis y cualquier otra enfermedad resultante de la pérdida de la capacidad de los fotorreceptores. Una etapa de diagnóstico puede comprender una prueba visual, por ejemplo una prueba de reflejo pupilar a la luz (PLR), prueba de agudeza visual (LogMAR), pruebas de diagnóstico clínico, por ejemplo, biomicroscopía/examen clínico ocular/retinal con lámpara de hendidura; pruebas de visión de color, pruebas de campo visual, contraste/sensibilidad de campo completo; pruebas de electrodiagnóstico que incluyen, por ejemplo, EGG, VEP; imagenología, fotografía de fondo de retinal, OCT y oftalmoscopio láser de barrido óptico adaptativo (AOSLO). Otras pruebas adecuadas serán conocidas por los expertos en la materia.

De acuerdo con la invención, la pupila del ojo a tratar se dilata primero, por ejemplo, mediante la aplicación de midriático, por ejemplo tropicamida y/o fenilefrina y/o ciclopentolato. De acuerdo con la invención, se puede acceder a la retina, por ejemplo, mediante cirugía.

La invención puede comprender controlar la visión de un sujeto que ha sido tratado por cualquier mejora en la visión. Las mejoras en la visión pueden ser una o más de las siguientes: mayor reflejo pupilar a la luz (PLR), mayor sensibilidad de contraste, mayor resolución de parpadeo de baja o alta frecuencia, y mayor detección de imágenes en movimiento. Además, el aumento de la actividad locomotora inducida por la luz puede mejorarse en animales como ratones. Una mejora en la visión puede ser la capacidad de responder o detectar luz a 10^{15} - 10^{13} fotones/cm²/s de irradiancia cornea. Una mejora en la visión puede comprender una respuesta ENCENDIDA sostenida, ENCENDIDA transitoria, APAGADA excitadora, APAGADA inhibitoria u ENCENDIDA-APAGADA. Preferiblemente, la mejora de la monitorización puede comprender un método para cuantificar la experiencia visual subjetiva de los sujetos o una medida objetiva de la respuesta a la luz, por ejemplo una prueba de reflejo pupilar a la luz (PLR), agudeza visual LogMAR, examen clínico de biomicroscopía con lámpara de hendidura; pruebas de visión en color, pruebas de campo visual, contraste/sensibilidad de campo completo; electrodiagnóstico: ERG, VEP; imagenología: fotografía de fondo de retina, OCT, oftalmoscopio láser de escaneo de óptica adaptativa (AOSLO) o tareas de navegación en laberintos.

Un sujeto puede ser monitorizado cada 6, 8, 10, 12 o 24 horas, o cada 2, 3, 4, 5 días. Esto puede repetirse después de 1, 2, 3, 4, 5, 6 meses o un año o más.

El término "*in vivo*" se refiere al entorno natural (por ejemplo, en un animal o una célula) y a procesos o reacciones que ocurren dentro de ese entorno natural (por ejemplo, en el cuerpo de un sujeto).

La presente invención se basa en dirigir una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible a las células retinales internas, para compensar la degeneración de las células fotorreceptoras en la retina. Las células a las que se dirige la secuencia de ácido nucleico son células de la retina que están vivas y son capaces de expresar una secuencia foránea de ácido nucleico. En el presente documento, una célula retinal es una célula de la retina, que es una célula nerviosa o neuronal y es capaz de excitarse y transmitir una señal eléctrica. Preferiblemente, una célula retinal objetivo será capaz de generar una señal eléctrica e iniciar la cascada de señalización que conduce a la transmisión de señal al nervio óptico. Una célula retinal puede ser un bastón o un cono, y/o puede ser una célula no fotorreceptora (es decir, una célula retinal que en su forma nativa no responde a la luz). Una célula retinal puede incluir uno o más tipos de células seleccionadas del grupo que consiste en bastones, conos, células bipolar ENCENDIDA, células bipolar APAGADA, células horizontales, células ganglionares, células Muller y/o células amacrinas.

Por lo tanto, cuando una célula retinal objetivo es una célula bipolar ENCENDIDA, una célula bipolar APAGADA, una célula horizontal, una célula ganglionar y/o una célula amacrina de la retina, se puede hacer referencia a la expresión del ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible como expresión ectópica. Por lo tanto, la presente invención incluye dentro de su alcance un método de expresión ectópica de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible en una célula no fotorreceptora. Dicha expresión ectópica tiene el efecto de proporcionar la función fotorreceptora a una célula, mediante la expresión de una proteína fotosensible heteróloga en la misma. Esto sirve para aumentar la capacidad fotorreceptiva de la retina donde se observa degeneración. La administración conjunta de enzimas de degradación de la matriz extracelular con la secuencia de ácido nucleico sirve para mejorar la transducción de la secuencia de ácido nucleico en las células retinales objetivo.

Una célula puede ser una procarionta o eucarionta. Puede ser una célula bacteriana como *E. coli*, o puede ser una célula de mamífero o no de mamífero, por ejemplo, una célula de insecto, una célula de levadura, una línea celular o un sistema de expresión libre de células, por ejemplo, para su uso en la generación de un vector o composición de la invención. Una célula retinal objetivo puede ser una célula bipolar ENCENDIDA, una célula bipolar APAGADA, una célula horizontal, una célula ganglionar y/o una célula amacrina.

Las células horizontales son células de retina interna, involucradas en el procesamiento de señales y la retroalimentación a las células fotorreceptoras; las células bipolares son células retinales internas y se comunican entre las bastones/conos y las células amacrinas y/o ganglionares; las células amacrinas se encuentran en la retina interna y permiten la comunicación entre la ruta del fotorreceptor y las células ganglionares; las células ganglionares son células retinales más internas que transmiten la señal de las células fotorreceptoras al nervio óptico.

La referencia a una célula en el presente documento incluye la progenie de la célula. Preferiblemente, las modificaciones a una célula de acuerdo con la presente invención también se producen en generaciones sucesivas de las células huésped transformadas. Las células de la progenie que pueden no ser idénticas a la célula objetivo inicial pero preferiblemente

también exhibirán la expresión de la proteína fotosensible no nativa.

La presente invención puede usarse para el tratamiento de cualquier trastorno que se caracterice por una degeneración de células fotorreceptoras en el ojo, típicamente una degeneración que es suficiente para dar como resultado una pérdida de visión parcial o completa. Los ejemplos de condiciones que pueden ser tratadas o mejoradas por la presente invención incluyen una distrofia retinal (pigmentosa retinal) que incluye una distrofia de bastones, una distrofia de bastones y conos, una distrofia de conos y bastones, una distrofia de conos y una distrofia macular; otras formas de degeneración retinal o macular (por ejemplo, degeneración macular relacionada con la edad), una condición isquémica, edema (macular o retinal), uveítis y cualquier otra enfermedad resultante de la pérdida de la capacidad del fotorreceptor.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a cualquier mamífero o no mamífero. Los mamíferos incluyen, entre otros, humanos, vertebrados como roedores, primates no humanos, vacas, caballos, perros, gatos, cerdos, ovejas, cabras, jirafas, yaks, ciervos, camellos, llamas, antílopes, liebres y conejos.

En este documento, la referencia a "un" o "uno, una" incluye dentro de su alcance tanto el singular como el plural, es decir, uno o más.

A menos que se indique lo contrario, las características y realizaciones de cada aspecto se aplican a los otros aspectos de la invención, cambiando lo que haya que cambiar.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, las palabras "comprenden" y "contienen" y variaciones de las mismas significan "que incluyen pero no se limitan a", y no tienen la intención de (y no) excluir a otras fracciones, aditivos, componentes, números enteros o etapas. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones de esta memoria descriptiva, el singular abarca el plural a menos que el contexto requiera lo contrario. En particular, cuando se usa el artículo indefinido, se entiende que la memoria descriptiva contempla el plural como el singular, a menos que el contexto requiera lo contrario.

Debe entenderse que los rasgos, números enteros, características, compuestos, fracciones o grupos químicos descritos en junto con un aspecto particular, realización o ejemplo de la invención son aplicables a cualquier otro aspecto, realización o ejemplo descrito en el presente documento a menos que sea incompatible con el mismo. Todas las características divulgadas en esta memoria descriptiva (incluidas cualquiera de las reivindicaciones, el resumen y los dibujos adjuntos), y/o todos las etapas de cualquier método o proceso así divulgado, pueden combinarse en cualquier combinación, excepto combinaciones donde al menos algunas de dichas características y/o etapas son mutuamente excluyentes. La invención no está restringida a los detalles de ninguna de las realizaciones anteriores. La invención se extiende a cualquier combinación nueva, o novedosa, de las características descritas en esta memoria descriptiva (incluida cualquiera de las reivindicaciones, resumen y dibujos adjuntos), o cualquier combinación nueva o novedosa, de las etapas de cualquier método o proceso así divulgado.

Ejemplos

En este estudio, se investigó la viabilidad de restaurar la capacidad de respuesta a la luz a las retinas rd1 ciegas mediante la expresión de opsina de bastones humana en las neuronas retinales internas supervivientes utilizando la terapia génica intravítrea AAV. Se estudió el suministro tanto no dirigido (neurona no selectiva) como dirigida (selectiva para células ONBP). Además, se examinaron las propiedades de las respuestas restauradas *in vivo* y la capacidad de los ratones ciegos tratados para resolver el procesamiento de imágenes más sofisticado, incluyendo parpadeos de campo completo, detección de contraste y escenas naturalistas.

La opsina de bastón ectópica no dirigida y dirigida recupera con éxito la visión a través de un código visual diverso que involucra rutas de ENCENDIDO y APAGADO. Las respuestas restauradas se transmiten más allá de la retina hacia las rutas visuales del SNC y funcionan bajo el rango de intensidad de luz de la visión normal de cono (y bastón), así como bajo condiciones adaptadas a la luz. Las respuestas son lo suficientemente robustas como para conducir a un comportamiento locomotor inducido por la luz en ratones tratados bajo iluminación equivalente a la iluminación de una habitación. Además, los resultados muestran que los ratones con células bipolar ENCENDIDA específicamente seleccionadas pueden resolver funciones visuales más complejas, incluyendo parpadeos de campo completo, detección de contraste y escenas de películas naturalistas con cambios en patrones espaciales y movimiento de objetos.

1. Inyecciones intraoculares y administración de genes mediante AAV (Figura 1)

Se usaron ratones adultos C3H/HeJ (rd1) en este estudio. Específicamente, una mutación nula *pde65b* en ratones rd1 conduce a una pérdida completa de fotorreceptores por *p90* (Crater-Dawson et al., 1978, Farber et al., 1994). (Importante tener en cuenta que la mutación no afecta a la rodopsina en sí). Para responder si la opsina de bastones puede expresarse fuera de los fotorreceptores *in vivo*, se inyectó el casete de expresión génica (Figura 1A) por vía intravítrea en ratones rd1 adultos. Teniendo en cuenta el potencial de traducción de este enfoque, se utilizó un vector AAV2/2 clínicamente seguro y una versión humanizada de la opsina de bastones. Se empleó la inyección intravítrea para lograr una transducción retinal más generalizada y minimizar las posibles complicaciones asociadas con un suministro alternativo de vectores subretinales. El enfoque subretinal normalmente conduce a la transducción localizada en el sitio de inyección. Se inyectó conjuntamente una combinación optimizada de enzimas glucosídicas para mejorar la transducción y permitir que el vector penetre más profundamente en la retina. Se desconoce qué tipos de células, si las

hay, fuera de los fotorreceptores nativos expresarían la opsina de bastones. La expresión no dirigida se estudió primero, utilizando un promotor pan-neuronal fuerte, CAG.

5 Las retinas se recolectaron cuatro a seis meses después de la inyección y las secciones criogénicas de la retina se inmunomarcaron con anticuerpo contra opsina de bastón humana. La expresión se confirmó usando microscopía fluorescente. La opsina de bastones se expresó bien fuera de los fotorreceptores como lo confirman los somas celulares fuertemente marcados (Figura 1B). La expresión se localizó en la membrana plasmática y se observó tanto en la capa RGC (Figura 1C) como en la INL (Figura 1D). Es probable que con un promotor no selectivo se transdujeran varios tipos de células diferentes en el INL, incluidas algunas células horizontales y amacrinas, aunque en general los cuerpos celulares transducidos en el INL tenían características de células bipolares (Figura 1D). La expresión de la opsina de bastón fue pan-retinal, aunque en el INL fue irregular con profundidades variables de penetración. En comparación, no se observó fluorescencia en el grupo inyectado con PBS de control. Además, las retinas de tipo silvestre no inyectadas tratadas con anticuerpo contra la opsina de bastones mostraron una fluorescencia clara en los segmentos externos del fotorreceptor, lo que indica que el anticuerpo es específico para la opsina de bastones sin marcación fuera del objetivo.

Resultados:

15 Pupilometría:

Figura 2. Restauración del reflejo pupilar a la luz después del tratamiento con rodopsina. Curvas de respuesta a la irradiancia para la constricción pupilar máxima durante 10 s de luz blanca con filtros de densidad neutra ND4 (más tenue) hasta ND0 (más brillante). Los ojos tratados con rodopsina (Rd RHO) muestran una mejora notable en la sensibilidad visual en comparación con los ojos inyectados con GFP (Rd GFP). Los datos para ratones C57 de tipo silvestre inyectados con mezcla de PBS/enzima se muestran para comparación (WT PBS). Los datos se normalizan al tamaño de la pupila inmediatamente antes del inicio de la luz. Los valores son la media \pm SEM, con n indicando el número de ojos examinados.

Electrofisiología *in vivo*:

Figura 3. Datos de registros de electrofisiología *in vivo*. Muestra representativa de histogramas de eventos periféricos para una serie de canales de registro (sigs) que muestran la tasa media de activación de las células LGN al estímulo de 2 s de luz a 405 nm presentada a un ojo tratado con rodopsina contralateral a intensidades crecientes (Figura 3A: - ND2, B: ND1, C: ND0; ND2 = más tenue, ND0 = más brillante). Una serie de canales (por ejemplo, sig 50, sig 52 a ND0 y ND1) mostraron respuestas luminosas robustas de "inicio rápido" con un "pico ENCENDIDA" después de encender la luz y un "pico APAGADA" cuando la luz se apaga. Las respuestas observadas son claramente distintas de las respuestas de luz nativas normalmente presentes en LGN de ratón rd1 después de la estimulación del ojo contralateral (Figura 3). Estas respuestas nativas se observaron tanto en ojos tratados con rodopsina como con GFP y muestran respuestas sostenidas típicas de "inicio lento" (de células de ganglio retinal de melanopsina, Figura 3D) y respuestas rápidas muy transitorias (de fotorreceptores de conos supervivientes, Figura 3E). Por lo tanto, las respuestas "restauradas" (Figura 3A-C) provienen de células retinales (ganglio retinal o células bipolares) con propiedades fotorreceptivas inducidas por la expresión ectópica de rodopsina.

35 Registros *in vitro* de MEA:

Figura 4. Datos de registros *in vitro* de MEA. Muestra representativa de histogramas de eventos periféricos para una serie de canales de registro (sigs) que muestran la velocidad de activación media de las células ganglionares de la retina al estímulo de 2 s de luz a 405 nm aplicada a las retinas aisladas a intensidades crecientes (Figura 4A: ND2, B: ND1, C: ND0; ND2 = más tenue, ND0 = más brillante). Varios canales mostraron respuestas luminosas robustas de "inicio rápido" con algunos canales (por ejemplo, sig 35, sig 36 en ND0 y ND1) que muestran un "pico ENCENDIDA" después de encender la luz y un "pico APAGADA" cuando se apaga la luz. Las respuestas observadas son claramente distintas de las respuestas de luz nativas normalmente presentes en la retina de ratón rd1 después de la estimulación con luz (Figura 5). Estas respuestas nativas se observaron tanto en ojos tratados con rodopsina como con GFP y muestran respuestas sostenidas típicas de "inicio lento" (de células de ganglio retinal de melanopsina, por ejemplo, Figura 5, sig 37). Por lo tanto, las nuevas respuestas (Figura 4A-C) se originan en las células de la retina con propiedades fotorreceptivas prestadas de la expresión ectópica de rodopsina.

Restauración de la actividad evocada por la luz en células ganglionares de la retina: evaluación funcional de las respuestas de opsina de bastones *in vitro*

A continuación, se deseaba confirmar que la opsina de bastones expresada ectópicamente podía generar respuestas de luz funcionales en la retina ciega. Los explantes retinales se montaron en una matriz de electrodos múltiples para probar la actividad evocada por luz. Las retinas inyectadas con opsina de bastones (CAG-hRho) de ratones rd1 (4-6 m de edad) mostraron células sensibles a la luz con una velocidad de activación inicial robusta después de la estimulación con destellos de campo completo de dos segundos de luz blanca de amplio espectro a 15,4 log fotones/cm²/s. Sin embargo, después de algunas presentaciones repetidas, la actividad evocada por la luz disminuyó a una baja frecuencia de picos, lo que sugiere un efecto de blanqueo. Esto no fue sorprendente para las preparaciones *in vitro* en las que los suministros endógenos de 9-cis se agotan rápidamente. Sin embargo, la adición de 9-cis a la preparación provocó una actividad neuronal robusta con respuestas fuertemente reproducibles. Además, se observaron diversos perfiles de respuesta en la población de células sensibles a la luz (n = 6 retinas), incluidas las respuestas sostenidas de ENCENDIDO, transitorias

de ENCENDIDO y APAGADO. Por el contrario, las retinas de control emparejadas por edad inyectadas con GFP (CAG-GFP) no mostraron actividad evocada por la luz después de la presentación del mismo estímulo de luz consistente con la ausencia de fotorreceptores ($n = 2$ retinas). (También fue posible generar respuestas a la luz en las retinas tratadas con opsina de bastones a intensidades de luz más bajas ($14,4 \log$ fotones/cm²/s, Figura 1H y $13,4 \log$ fotones/cm²/s)) lo que representa una mejora significativa en la sensibilidad a la luz comparado con otras estrategias optogenéticas que usan al menos 5-6 unidades logarítmicas de mayor intensidad de luz que la necesaria para activar la visión de conos nativos (Gaub, Lagali, etc.).

Las respuestas mediadas por opsina de bastones ectópicas se transmiten a la LGN: caracterización de las respuestas restauradas *in vivo* (Figura 3)

Debido a que el blanqueamiento con opsina de bastones, sin un suministro exógeno constante de cromóforo (9-cis retinal), era un problema para los experimentos *in vitro*, se probó la actividad neuronal *in vivo* para determinar si habría suficiente retinal en retinas intactas para permitir el reciclaje del cromóforo y evitar el blanqueamiento. Además, se investigó si las respuestas restauradas son lo suficientemente robustas como para activar centros visuales superiores en el contexto de la degeneración y remodelación de la retina. Las respuestas neuronales del núcleo geniculado lateral dorsal, dLGN, se registraron en ambas hemisferas simultáneamente, donde un ojo fue tratado previamente con opsina de bastones y el otro, inyectado con GFP, sirvió como control interno. El dLGN es la principal parte retinorreceptora del cerebro y contiene las neuronas que transmiten señales a la corteza visual. Las respuestas del dLGN, la primera conexión sináptica para los RGC, se estudiaron para obtener la mejor idea de las propiedades de las respuestas restauradas. Se encontró un número significativamente mayor de respuestas de luz a través de dLGN (157) en comparación con los controles internos (4) después de destellos de campo completo de dos segundos de luz a 410 nm a $15,4 \log$ fotones/cm²/s. Las células sensibles a la luz se identificaron de acuerdo con criterios objetivos mediante el análisis del histograma de tiempo de estímulo periférico (PSTH) en el Neuroexplorer (Nex Technologies) donde la velocidad de activación promedio tuvo que cruzar el IC del 95% después del inicio o la compensación del estímulo, en comparación con la línea base. El intervalo de tiempo de PSTH para el estímulo de 2 segundos fue de -2 segundos a 5 segundos, y el tamaño del cajón fue de 250 ms. Se excluyeron los artefactos claros que conducen a falsos positivos. Se generaron "mapas de calor" para incluir todas las células sensibles a la luz de cada grupo y ordenar las respuestas de acuerdo con la amplitud de la respuesta sostenida durante el segundo inicial de una presentación de estímulo de 2 segundos. Los colores verdes (+1) representan altas velocidades de activación y los colores rosa/púrpura (-1) bajas velocidades de activación. La figura 3F muestra claramente una naturaleza diversa de las respuestas restauradas, incluidas las respuestas sostenidas, transitorias, de ENCENDIDO y APAGADO, como se encuentran normalmente en las retinas de WT. Por el contrario, las células sensibles a la luz ($n = 4$) que se encontraron en el grupo de control tuvieron un inicio lento ENCENDIDO sostenido, probablemente originadas en ipRGC nativas. No se encontró que el blanqueamiento sea un problema para las respuestas de luz *in vivo*, que mostraron una activación robusta a través de muchos ensayos repetidos.

Para capturar la diversidad de respuestas restauradas observadas en un solo nivel unitario (pero encontradas en todas las retinas probadas), las respuestas individuales se estudiaron sistemáticamente a través de sus histogramas de tiempo de estímulo periférico (PSTH) y los recuentos de cajón de prueba correspondientes (TBC). Promediar a través de la población de células sería difícil dado que algunas células están excitadas por la luz ENCENDIDA (respuestas de ENCENDIDO) algunas inhibidas por la luz ENCENDIDA (respuestas inhibitorias APAGADA), algunas excitadas por luz APAGADA (excitador APAGADA) y algunas excitadas por la luz ENCENDIDA y APAGADA (células ENCENDIDA-APAGADA). Tanto las respuestas sostenidas (paso de luz de 10 y 2 segundos, Figura 3G) como las más transitorias (paso de luz de 2 segundos, Figura 3H) se evocaron en los ojos tratados, comparables a las de las retinas WT (inserto). Para las respuestas de ENCENDIDO también se encontraron muchas respuestas de APAGADO (Figura 3I) y algunas respuestas de ENCENDIDO-APAGADO (Figura 3J). En la población de células sensibles a la luz, se encontraron 99/157 (63,1%) de células ENCENDIDA, 46/157 (29,3%) de células APAGADA y 12/157 (7,6%) de células ENCENDIDA-APAGADA (Figura 3E). Estos se clasificaron ampliamente en células sostenidas de ENCENDIDO (51/157; 32,5%), células transitorias de ENCENDIDO (48/157; 30,6%), células excitadoras de APAGADO (29/157; 18,5%), células inhibitorias APAGADA (17/157; 10,8 %) y células ENCENDIDA-APAGADA (12/157; 7,6%). La velocidad de activación media osciló entre 20-100Hz a través de las respuestas restauradas. Se encontraron respuestas con latencias cortas (inicio dentro de 50-100 ms: 2D, célula 1; 2E, célula 1) así como latencias más largas (inicio dentro de 500 ms: 2D, célula 3). La velocidad de activación para las respuestas más sostenidas regresó rápidamente a la línea base (cientos de milisegundos de apagado del estímulo de luz, 2D, célula 3) aunque se encontraron algunas células con una activación más persistente (segundos después de apagar la luz, 2D, célula 2). (similar a otros estudios, Lagali, Flannery, respuestas WT)

Características de sensibilidad y contraste de respuestas LGN restauradas

Estrategias optogenéticas actuales basadas en ChR ($10^{15} - 10^{17}$ fotones/cm²/s) e interruptores fotosintéticos ($10^{15} - 10^{18}$ fotones/cm²/s) requieren altas intensidades de luz para la activación y la exposición a largo plazo de estas intensidades de luz puede ser perjudicial para la retina. En los experimentos, las neuronas restauradas operan bajo un rango dinámico de intensidades de luz equivalentes a una iluminación natural luz día ($10^{13} - 10^{15}$ fotones/cm²/s) (Figura 6). De manera importante, se encontraron respuestas robustas, sostenidas y transitorias repetibles, de ENCENDIDO y APAGADO a través de estas intensidades de luz, lo que indica cuán sensible es el sistema. También se encontraron algunas respuestas de luz a intensidades de luz más bajas (10^{12} y 10^{11} , aunque no fueron tan fácilmente/también/pobremamente reproducibles (datos no mostrados). No se registraron respuestas de luz convincentes a niveles inferiores a 10^{15} fotones/cm²/s cuando se estimularon las retinas de rd1 no tratadas.

Hasta ahora, los estudios sobre nuevas herramientas optogenéticas han caracterizado las respuestas restauradas en condiciones adaptadas a la oscuridad, utilizando pasos de luz de campo completo desde la oscuridad. Aunque esto aumenta la posibilidad de evocar respuestas neuronales fuertes, estas condiciones rara vez están presentes en escenarios de la vida real. El sistema se probó en condiciones más naturales, en estados adaptados a la luz. Se registraron respuestas robustas, de alta amplitud, repetibles en condiciones adaptadas a la luz, contraste de Michelson del 96% (Figura 6B). No se encontraron células de detección de contraste en respuesta a la estimulación adaptada a la luz de las retinas de rd1 de control.

(Los contrastes más bajos (66% y 33%) también provocaron respuestas medibles, aunque estas no fueron tan altamente reproducibles entre los ensayos repetidos (véase el suplemento/no mostrado).

10 Restricción de la expresión ectópica de opsina de bastones usando un promotor específico de células

La diversidad del código visual generado con expresión ectópica sin restricciones de la opsina de bastones fue alentadora. Sin embargo, se decidió investigar si habría algún cambio en este código si la expresión de la opsina de bastones se restringía a la "ruta de ENCENDIDO" solamente. Por lo tanto, la opsina de bastones se expresó en células bipolares de ENCENDIDO usando un promotor Grm6 específico de la célula (Figura 7A-C).

15 Las Figuras 8-10 muestran respuestas de luz dLGN restauradas en diversas condiciones de luz para ratones que han sido tratados con opsina de bastones dirigida a células ONBP. La sensibilidad se demostró hasta condiciones normales de iluminación. Las cifras de irradiación citadas son para mediciones corneales. La irradiancia retinal será aproximadamente un orden de magnitud menor.

20 Los registros de LGN *in vivo* de estos ratones también muestran un número significativamente mayor de respuestas a la luz ($n = 100$) en comparación con los controles internos ($n = 6$) después de la estimulación con destellos de campo completo (2 s) de luz a 410 nm a 15,4 log fotones/cm²/s. Una vez más, se observó un rango de perfiles de respuesta: sostenida, transitoria, de ENCENDIDO y APAGADO (excitador e inhibidor) en el grupo tratado con opsina de bastones. En comparación con las respuestas no dirigidas, las respuestas a la luz de las células BP de ENCENDIDO seleccionadas se distribuyeron de manera más uniforme entre los tipos de ENCENDIDO y APAGADO. A través de la población de células sensibles a la luz, se observaron 48/84 (57,1%) de respuestas de ENCENDIDO y 36/84 (42,9%) de respuestas de APAGADO. Estos se subdividieron ampliamente en células sostenidas de ENCENDIDO (34/84; 40,5%), células transitorias de ENCENDIDO (14/84; 16,6%), células excitadoras de APAGADO (6/84; 7,1%) y células inhibitoras APAGADA (30/84; 35,7 %). La caracterización más detallada de respuestas a la luz restauradas mostró respuestas más rápidas ENCENDIDA transitorias, sostenidas de ENCENDIDO y APAGADO transitorias (inicio en cientos de ms) y respuestas de APAGADO inhibitoras más lentas (inicio en segundos). Estas respuestas de APAGADO inhibitoras robustas y retrasadas fueron una característica específica de la expresión de opsina de bastones dirigida (células 4G 2 y 3).

35 A continuación se investigó si la detección de sensibilidad y contraste de las respuestas dirigidas por bipolar ENCENDIDA es similar a la del grupo no dirigido. Se encontró un perfil de sensibilidad comparable de respuestas dirigidas por bipolar ENCENDIDA para el grupo no selectivo/no dirigido y se registraron respuestas de luz a 13,4 log fotones/cm²/s (Figura 4H). Del mismo modo, en condiciones adaptadas de luz, también se encontró células que responden al nivel de contraste de Michelson (96%, Figura 4I).

(Se registraron una amplitud más baja y respuestas menos reproducibles a niveles de contraste más bajos (66% y 33%), similares a las observadas en retinas no seleccionadas (datos no mostrados))

40 Respuestas conductuales inducidas por la luz

A continuación, se investigó si la información visual transmitida al cerebro, impulsada por la transducción de opsina de bastones ectópica no dirigida y dirigida, podría restaurar las funciones visuales perdidas en ratones rd1 ciegos. Primero, se probó una respuesta de comportamiento simple a la luz, el reflejo pupilar a la luz (PLR). Este reflejo normalmente está mediado por melanopsina que expresa ipRGC (Lucas RJ, et al., Science. Enero 10 de 2003; 299 (5604): 245-7). Y se retiene a un umbral alto en ratones rd1 después de la degeneración del fotorreceptor (Lucas RJ, et al., Nat Neurosci. Junio de 2001; 4 (6): 621-6, Lin B, Proc Natl Acad Sci US A. 14 de Octubre de 2008; 105 (41): 16009-14). Se registraron curvas de respuesta a la irradiancia para la constricción pupilar máxima durante diez segundos de luz blanca en un rango de intensidades de luz (Figura 11A). Se encontró PLR deteriorado en ratones de control inyectados con GFP, confirmando hallazgos previos. La expresión de opsina de bastones sin restricción restauró PLR comparable al comportamiento de tipo silvestre (Figura 11A-D). Sin embargo, con la expresión dirigida, el PLR se mantuvo en gran medida afectado (Figura 11A-C).

55 Luego se preguntó si el código visual optogenético restaurado podría soportar una discriminación visual más compleja a nivel de comportamiento. Motivado por las pruebas clásicas de campo abierto en caja de luz/oscuridad (Bourin M, Hascoët M (2003), Eur J Pharmacol 463 (1-3): 55-65), se midió el comportamiento locomotor en respuesta a varios estímulos de luz artificial y natural. Los ratones se colocaron en una caja de luz/oscuridad modificada de campo abierto y permitieron el movimiento libre entre las dos zonas a través de una abertura en la pared de separación. Los monitores de los ordenadores de pantalla plana fuera de cada zona se usaron para mostrar una variedad de estímulos visuales. Las intensidades de luz de los estímulos fueron equivalentes a los niveles de iluminación interior (rango de 0,00132 W/m² para

pantalla negra hasta $0,116 \text{ W/m}^2$ para pantalla blanca). Primero se probó la discriminación simple de luz oscuridad. Después de la habituación al ambiente nuevo (3 min) se permitió a los ratones explorar la caja durante 5 minutos en oscuridad (radiancia de pantalla oscura = $0,004072 \text{ Wsr}^{-1} \text{ m}^{-2}$; irradiancia = $0,00132 \text{ W/m}^2$), seguido de 5 minutos en luz blanca (radiancia de pantalla blanca = $0,06526 \text{ Wsr}^{-1} \text{ m}^{-2}$; irradiancia = $0,116 \text{ W/m}^2$). El ensayo locomotor se evaluó primero en ratones de tipo silvestre donde la gráfica de actividad muestra un aumento significativo en la locomoción en los primeros 30 segundos de transición de la oscuridad a la luz (Figura 12, distancia media en la oscuridad = $24,46 \pm 7,00$ cm; distancia media en luz = $147,5 \pm 5,09$ cm; $p = 0,0066$). Los ratones ciegos rd1 no mostraron cambios significativos en la actividad durante esta transición de luz oscuridad (distancia media en oscuridad = $91,75 \pm 7,70$ cm; distancia media en luz = $100,2 \pm 8,145$ cm $p = 0,5541$). Sin embargo, las gráficas de actividad para los grupos tratados, rd1-hRho-CAG y rd1-hRho-grm6, muestran una disminución repentina en la actividad motora cuando se enciende la luz. Este comportamiento de "congelación" inducido por la luz fue significativo en los primeros 30 segundos de transición de oscuro a claro (para rd1-hRho-CAG, distancia media en oscuridad = $98,40 \pm 16,12$ cm; distancia media en luz = $69,73 \pm 13,32$ cm; $p = 0,0070$; para rd1-hRho-grm6 distancia media en la oscuridad = $112,9 \pm 21,47$ cm; distancia media en luz = $68,37 \pm 16,81$ cm; $p = 0,0224$).

Después de establecer que los ratones tratados pueden distinguir la luz de la oscuridad, se probó su comportamiento en respuesta a estímulos visuales más dinámicos. La actividad locomotora en condiciones de luz adaptada (5 minutos de exposición a la luz de la pantalla gris, radiancia = $0,03342 \text{ Wsr}^{-1} \text{ m}^{-2}$; irradiancia = $0,0663 \text{ W/m}^2$) se comparó con el parpadeo de campo completo a 4 Hz (Figura 13A). El grupo Rd1-hRho-grm6 pudo resolver esta frecuencia de parpadeo (distancia media en gris = $151,3 \pm 34,95$ cm; distancia media en parpadeo = $83,7 \pm 13,76$ cm; $p = 0,0466$), mientras que los ratones rd1-hRho-CAG y ciegos no tratados no mostraron cambios en el comportamiento (Figura 13B). Luego se probó rd1-hRho-CAG a una frecuencia más baja, a 2 Hz y se encontró que sí responden (límite probable de este sistema) (datos no mostrados).

Como los ratones rd1-hRho-grm6 dirigidos tuvieron la mejor respuesta con un parpadeo de campo completo, este grupo se probó adicionalmente para ver si los ratones pueden discriminar cambios más sutiles en la luz y detectar contraste. De hecho, se demostró que los ratones respondieron a diferentes contrastes de Michelson (Figura 14; distancia media en gris = $179,3 \pm 17,34$ cm; distancia media en parpadeo = $127,2 \pm 16,29$ cm; $p = 0,0238$ con contraste de 68,6% y distancia media en gris = $151,3 \pm 34,95$ cm; distancia media en parpadeo = $83,7 \pm 13,76$ cm; $p = 0,0466$ con 100% de contraste).

También se observaron frecuencias de parpadeo más altas en ratones rd1-hRho-grm6, 10 Hz y 20 Hz. No se encontró respuesta a 20 Hz pero sí una respuesta convincente a 10 Hz (Figura 15; distancia media en gris = $93,64 \pm 26,39$ cm; distancia media en parpadeo = $162,6 \pm 18,57$ cm; $p = 0,039$ a 10 Hz).

Respuestas a escenas naturalistas

Habiendo descrito las características de las respuestas restauradas usando una variedad de estímulos artificiales, se propuso determinar si la opsina de bastones ectópica podría generar respuestas visuales a nivel cerebral en escenas más naturalistas con propiedades espaciales. Para este fin, se proyectó una película naturalista (ratones que se mueven alrededor de una zona abierta) a ratones anestesiados con Rd1-CAG-hRho y Rd1-grm6-hRho y se registraron las respuestas *in vivo* del LGN. La película de 30 segundos se presentó repetidamente durante un período de 30 minutos permitiendo la identificación de células con patrones de activación reproducibles en muchas presentaciones. Las neuronas individuales cuya velocidad de activación está modulada por características particulares de la escena de la película se observaron después de la estimulación de las retinas no seleccionadas y seleccionadas (Figura 16A a C); sin neuronas "sensibles a la película" de los ojos de control.

Entonces se investigó si los ratones pueden ver las escenas naturalistas. En un ensayo de locomoción conductual de campo abierto, se presentó a los ratones una película naturalista con un búho que se acercaba en la caja de prueba. De hecho, se descubrió que los ratones rd1-hRho-grm6 respondieron a un búho que se acerca (Figura 6C) que muestra un cambio significativo en el comportamiento locomotor en una transición de 30 segundos de luz uniforme a una escena de película (Figura 14; distancia media en gris = $67,68 \pm 22,05$; distancia media en película natural = $110,2 \pm 19,44$; $p = 0,0079$). Curiosamente, no mostraron un comportamiento de congelación, pero de hecho aumentaron su actividad motora, probablemente en un intento de escapar del depredador. No se encontraron cambios en el comportamiento en respuesta a una película en ratones ciegos Rd1 o ratones Rd1-hRho-CAG.

Materiales y métodos

Animales

Estos ratones son un modelo de forma severa y rápida de degeneración retinal, similar a algunas formas de retinitis pigmentosa en humanos (McLaughlin et al., 1993). Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las regulaciones del Ministerio del Interior del Reino Unido para el cuidado y uso de animales de laboratorio, la Ley de Animales (Procedimientos Científicos) del Reino Unido y el Cuerpo de Bienestar Animal de la Universidad de Manchester. Los animales se mantuvieron bajo un ciclo de luz: oscuridad de 12 horas y se les suministró comida y agua a voluntad.

Suministro de genes a través de AAV

Las inyecciones intraoculares se llevaron a cabo en ratones a las seis semanas de edad bajo anestesia general usando

isofluorano. Antes de las inyecciones, las pupilas se dilataron con tropicamida y fenilefrina. Una aguja ultrafina hecha a medida (aguja Hamilton RN calibre 34, suministrada por ESSLAB) se unió a una jeringa de vidrio Hamilton de 5 μ L y se pasó a 45 grados a través de la pars plana hacia la cavidad vítrea, evitando cuidadosamente la lente y los vasos sanguíneos. La inyección se realizó bajo una visualización directa de la punta de la aguja a través de los ojos con cubierta deslizante bajo el microscopio operativo. Los vectores, rAAV serotipo 2 (rAAV2/2, o simplemente AAV2) que expresan opsina de bastones o GFP bajo el control de un promotor pan-neuronal ubicuo fuerte (CAG) o promotor específico de células bipolares de ENCENDIDO (Grm6) se obtuvieron a través de Vector Biolabs, Filadelfia, Estados Unidos. El promotor CAG es una fusión de potenciador temprano de CMV y promotor de β -actina de pollo. El promotor Grm6 es una fusión de la secuencia potenciadora de 200 pares de bases del gen Grm6 de ratón que codifica el receptor de glutamato metabotrópico específico de células bipolares de ENCENDIDO, mGluR6 y un promotor eucariota SV40. El gen de interés en cada caso estaba flanqueado por dominios de repetición terminal invertida (ITR) y estabilizado por secuencia de señal de poliadenilación (poliA) y un elemento regulador postranscripcional de hepatitis de marmota (WPRE).

Se inyectó un ojo de cada ratón con la constructo de expresión de opsina de bastones (ya sea AAV2-ITR-CAG-hRho-polyA-WPRE-ITR para expresión no seleccionada o AAV2-ITR-grm6-hRho-polyA-WPRE-ITR para expresión seleccionada) y el otro con el constructo de expresión GFP (ya sea AAV2-ITR-CAG-GFP-poliA-WPRE-ITR para expresión no seleccionada o AAV2-ITR-grm6-GFP-poliA-WPRE-ITR para expresión seleccionada). Cada ojo recibió 3 μ L de constructo viral que contenía 1×10^{13} recuentos genómicos, en combinación con 0,5 μ L de solución de enzima glicosídica que contenía 0,125 unidades de heparinasa III (EC 4.2.2.8) y hialuronano liasa (EC 4.2.2.1) obtenida de Sigma-Aldrich, Dorset, Reino Unido. Las soluciones enzimáticas se elaboraron en forma frescas el día de la inyección disolviendo las enzimas en solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS). El vector y las enzimas se mezclaron en una jeringa inmediatamente antes de una inyección ocular y se administraron en una única inyección combinada.

Procesamiento de tejidos, inmunohistoquímica y bioimagenología

Para el procesamiento de tejidos, se fijaron los oculares recuperados (> 6 semanas después de la inyección del vector) en paraformaldehído al 4% (PFA) durante 24 horas a 4 °C. El tejido se lavó luego en PBS y se fijó adicionalmente en sacarosa al 30% en PBS durante la noche a 4 °C. Los ojos fijados se protegieron criogénicamente en un medio de temperatura de corte óptimo (Raymond A Lamb Ltd., Eastbourne, Reino Unido) y se congelaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento. La sección retinal crioprotegida se cortó en un criostato (Leica, Microsystems) horizontalmente a través del ocular a 8-10 μ m de espesor desde el lado ventral al dorsal, de modo que cada sección contenía una sección transversal nasal hasta temporal completa de la retina. Se recogieron diez y doce secciones en cada portaobjetos que contenían secciones representativas de toda la retina. Los portaobjetos se almacenaron a -80 °C.

Para inmunohistoquímica, los portaobjetos se retiraron del congelador y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente durante 1 hora. Las secciones se permeabilizaron sumergiendo los portaobjetos en PBS con Tritón al 0,2% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de estas secciones, se bloquearon con PBS con Triton X-100 al 0,2% que contenía suero de burro al 10% (D9663; Sigma, Reino Unido) durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (Rodopsina antihumana de conejo, Abcam, Ab112576) se aplicó a una dilución de 1:200 en tampón de bloqueo (PBS con Triton X-100 al 0,2% y suero de burro al 2,5%) durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de lavar en PBS Tween al 0,05%, cuatro veces durante 10 minutos, las secciones se incubaron con anticuerpo secundario (anticuerpo anti-IgG de conejo de burro con Alexa Fluor® 546 (H + L), Life technologies, lote: 1504518) diluido 1:200 en PBS con Triton X-100 al 0,2% y suero de burro al 2,5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron cuatro veces durante 10 minutos en PBS Tween al 0,05% seguido de un lavado final con dH_2O . Después de eliminar el exceso de líquido, los portaobjetos se montaron con medios de montaje fluorescentes que contenían DAPI (Vectashield, Vector Laboratories Ltd., Peterborough, Reino Unido) para teñir los núcleos de las células.

Para bioimagenología, las secciones se analizaron bajo un microscopio vertical Olympus BX51 usando objetivos 4x, 10x y 20x Plan Flin y se capturaron las imágenes usando una cámara Coolsnap ES (Photometrics, Tucson, AZ) a través del software MetaVue (Molecular Devices Ltd. Wokingham, Reino Unido). Las imágenes se tomaron bajo conjuntos de filtros de paso de banda específicos y las imágenes combinadas de color se usaron para procesamiento adicional usando ImageJ.

Registros de matriz de electrodos múltiples

Se realizaron registros de matriz de electrodos múltiples en ratones rd1 tratados con opsina de bastones (n = 6) y controles de rd1 inyectados con GFP (n = 2). Los ojos enucleados se colocaron en una caja de Petri llena de aCSF carboxigenado (95% CO_2 /5% CO_2) (fluido cefalorraquídeo artificial, concentración en mM: NaCl 118, $NaHCO_3$ 25, NaH_2PO_4 1, KCl 3, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 2, $C_6H_{12}O_6$ 10, L-Glutamina 0,5). Luego, las retinas se aislaron cuidadosamente con luz roja difusa bajo un microscopio de disección y se montaron, con células ganglionares hacia abajo, en una matriz de electrodos múltiples de 60 o 256 canales (Multi Channel Systems, Reutlingen, Alemania). Los explantes de retina se acoplaron en su lugar con una membrana de diálisis pesada y se perfundió continuamente con aCSF carboxigenado a razón de 2,2 mL por minuto utilizando una bomba peristáltica (SCI400, Watson Marlow, Reino Unido), y se mantuvo a 32 °C utilizando un controlador de temperatura Universal Serial Bus que regula un calentador en línea para la entrada de aCSF. Los estímulos de luz (luz blanca) fueron presentados por una fuente generadora de luz personalizada (Lumencor, EE. UU.). A la intensidad más brillante, los LED emitían 15 Log fotones/cm²/s. Se usó una tarjeta de National Instruments (USB-6229) controlada por programas escritos en LabVIEW (versión 8.6, National Instruments, TX, EUA) para controlar la duración e

intensidad del estímulo al alterar la salida del LED y ajustar la rueda del filtro que contiene filtros de densidad neutra (Cairn Research Limited). Los estímulos se suministraron en pulsos de luz de 2 segundos con intervalos entre estímulos de 20 segundos durante 20-30 repeticiones a ND0 (15 log fotones/cm²/s) hasta ND4. Los datos se muestrearon a una frecuencia de 25 kHz durante la adquisición de actividad espontánea y evocada y se registraron para la clasificación fuera de línea utilizando un Offline Sorter (Plexon). Después de eliminar los artefactos claros comunes a todos los canales, se utilizaron análisis de componentes principales para discriminar unidades individuales, identificadas como grupos distintos de picos dentro del espacio del componente principal, con un período refractario claro en la distribución del intervalo entre picos. Luego, los datos de una sola unidad clasificados por picos se analizaron adicionalmente utilizando Neuroexplorer (Nex Technologies) y MATLAB R2010a (The Mathworks Inc.).

10 Pupílometría:

Se midió el reflejo pupilar a la luz (PLR) en ratones de tipo silvestre (6), ratones rd1-CAG-GFP (n = 16), ratones rd1-CAG-hRho (n = 10) y rd1-grm6-hRho (n = 6) a las seis u ocho semanas después de las inyecciones. Los ratones se adaptaron a la oscuridad durante 1 hora antes de los registros. Los estímulos de luz fueron proporcionados por una lámpara halógena de cuarzo y se transmitieron a lo largo de un haz de fibra óptica a una esfera reflectante integradora, que proporcionó luz uniforme en la córnea del ratón. El PLR consensual se registró en ratones no anestesiados, ligeramente lavados, en condiciones infrarrojas con una cámara CCD sensible al infrarrojo equipada con lente macro 10x y un filtro infrarrojo. Un obturador intermedio controlaba el tiempo de estímulo. Una única prueba duró 20 segundos: 5 segundos de luz APAGADA, 10 segundos de luz ENCENDIDA, 5 segundos de luz APAGADA. La intensidad de la luz se controló mediante filtros de densidad neutra (ND) y los ratones se sometieron a exposiciones a la luz blanca en una serie de intensidad ascendente, con ensayos individuales separados por al menos 5 minutos. Los valores de emisión de fotones para ND en log fotones/cm²/s variaron de 15,85 a ND0 hasta 10,85 a ND5. Las respuestas pupilares se cuantificaron a partir de las imágenes de video, usando el software Virtual Dub e ImageJ y los datos se normalizaron al área de la pupila inmediatamente antes del inicio de la luz.

Electrofisiología *in vivo*:

25 La electrofisiología *in vivo* se realizó en ratones de tipo silvestre (n = 2), ratones rd1-CAG-hRho (n = 7) y rd1-grm6-hRho (n = 5). Seis semanas después de las inyecciones y después de la medición de PLR, los ratones se anestesiaron con uretano (inyección intraperitoneal 1,7 g/kg; 30% p/v; Sigma Aldrich, Poole, Reino Unido). Los animales se inmovilizaron en un marco estereotáxico (SR-15M; Narishige International Ltd, Londres, Reino Unido) y la temperatura corporal central se mantuvo a 37 °C a través de una manta de calor homeotérmica (Harvard Apparatus, Edenbridge, Reino Unido). Las pupilas se dilataron con atropina y se aplicó aceite mineral (Sigma Aldrich) para retener la humedad corneal. Se realizó una pequeña craneotomía y durotomía (~1 mm²) directamente encima de cada núcleo geniculado lateral (LGN) utilizando coordenadas estereotáxicas de acuerdo con el atlas del ratón (Paxinos y Franklin, 2001; centro del orificio = bregma: -2,46 mm; línea media: -2,8). Se introdujo un electrodo de 32 canales (NeuroNexus Technologies Inc., MI, EE. UU.) en cada LGN en el centro del orificio (vástago medial: -2,5 mm con respecto a la línea media; profundidad: -2,6 mm con respecto a la superficie del cerebro en un ángulo de 18 grados) para el registro simultáneo de ambos LGN. Los ratones se dejaron durante 30 minutos antes de los registros, para adaptarse a la oscuridad y permitir que la actividad neuronal se estabilice después de la inserción del electrodo. Se proporcionaron estímulos visuales mediante un LED UV (Thorlab $\lambda_{\text{máx}}$: 405 nm) y se suministraron a través de fibra óptica a los conos oculares diseñados específicamente para cada ojo para minimizar cualquier posible fuga de luz. Se usó una tarjeta de National Instruments (USB-6229) controlada por programas escritos en LabVIEW (versión 8.6, National Instruments, TX, EUA) para controlar la duración e intensidad del estímulo al alterar la salida del LED y ajustar la rueda de filtro que contiene filtros de densidad neutra (ND) (Cairn Research Ltd). A la intensidad más brillante (ND0) los LED emitían 47 W/m² o 15,4 log fotones/cm²/s de flujo efectivo para la opsina de bastones. Los datos se obtuvieron utilizando un sistema Recorder64 (Plexon, TX, EE. UU.) con amplificación de señal mediante un platina principal acoplada a AC con ganancia de 20x (Plexon, TX) seguido por acondicionamiento del preamplificador que proporciona una ganancia total de 3500x. Los datos se filtraron en paso alto (300 Hz) y las formas de onda neurales con sello de tiempo se digitalizaron simultáneamente desde todos los canales a una velocidad de 40 kHz. Los datos de varias unidades se almacenaron luego para la clasificación y el análisis fuera de línea como para los datos de MEA descritos anteriormente.

50 A la intensidad más brillante, los LED emitieron 15 Log fotones/cm²/s. Los estímulos se suministraron de acuerdo con un protocolo de luz que consta de 2 partes. La Parte 1 incluyó destellos de oscuridad: 2 segundos de luz ENCENDIDA, 20 segundos de luz APAGADA con 10 segundos de compensación entre cada ojo. Este paradigma se repitió 30 veces con cada filtro ND que varía desde el más tenue (ND3 = 12,4 log fotones/cm²/s) hasta el más brillante (ND0 = 15,4 log fotones/cm²/s). También se usó una longitud de estímulo más larga para respuestas más sostenidas: 10 segundos ENCENDIDO, 30 segundos APAGADO con 15 segundos de compensación entre cada ojo. El paradigma se repitió entre 55 10 - 20 veces a ND3 hasta ND0.

La Parte 2 del protocolo de luz implicó el registro en condiciones adaptadas a la luz donde se aplicaron pasos de luz de 5 segundos a una iluminación de fondo estable con un contraste de Michelson del 96%. Hubo un intervalo entre estímulos de 20 segundos y una compensación de 10 segundos entre los dos ojos. Este paradigma se repitió diez veces.

60 (La Parte 2 del protocolo de luz involucraba el registro en condiciones adaptadas a la luz en el que se aplicaban contrastes de luz crecientes a una iluminación de fondo estable. Los contrastes de Michelson, 33%, 66% y 96% se aplicaron en

pasos de 5 segundos, con un intervalo entre estímulos de 20 segundos, y una compensación de 10 segundos entre los dos ojos. Este ciclo de paradigma se repitió diez veces).

5 También se registraron las respuestas a una película naturalista. Para esto, se obtuvo un conjunto separado de registros (ratones rd1-CAG-hRho; $n = 2$ y rd1-grm6-hRho; $n = 3$) de la dLGN contralateral al ojo tratado con opsina de bastones. Se usó una configuración experimental diferente, que involucra un proyector de dispositivo de espejo digital (DLP® LightCommander^{MR}; Logic PD Inc.), para maximizar las longitudes de onda utilizadas y la intensidad de la película. El generador de luz intrínseca del proyector se reemplazó por una fuente de luz LED multiespectral que contenía cuatro LED controlados de forma independiente ($\lambda_{\text{máx}}$ a 405 nm, 455 nm, 525 nm y 630 nm; Serie Phlatlight PT-120 (Luminus Devices)). La luz de los LED se combinó con una serie de espejos dicróicos (Thorlabs) y se dirigió al proyector. La película se presentó utilizando Python mediante el software PsychoPy versión 1.70.00. Presentaba ratones que se movían alrededor de una zona de comportamiento que incluía el movimiento y la aparición de objetos de diferentes tamaños (con ángulos visuales que varían de 0,5° a 36°) en un rango de orientaciones, velocidades y contrastes (contraste máximo de Michelson = 96%). La película carecía de diferencias de color, y los cambios en la irradiancia a través del tiempo fueron mínimos (desviación estándar de irradiancia = 5,94%). Las validaciones previas en ratones de tipo silvestre han mostrado respuestas indetectables para presentaciones de versiones desenfocadas, lo que indica que la mayoría de la actividad fue provocada por cambios en los patrones espaciales y el movimiento de los objetos.

10 Los datos se obtuvieron usando un sistema Recorder64 (Plexon, TX, EE. UU.) con amplificación de señal mediante un escenario principal acoplado a AC con ganancia de 20x (Plexon, TX) seguido de acondicionamiento del preamplificador que proporciona una ganancia total de 3500x. Los datos se filtraron con paso alto (300Hz) y las formas de onda neurales con sello de tiempo se digitalizaron simultáneamente desde todos los canales a una velocidad de 40 kHz, y se almacenaron para análisis fuera de línea.

15 Para confirmar la ubicación de los sitios de registro, el electrodo de registro se sumergió en un tinte fluorescente (Cell Tracker CM-Dil; Invitrogen) antes de la inserción en el cerebro. Después de los registros *in vivo*, se extrajo el cerebro del ratón y se fijó posteriormente durante la noche en paraformaldehído al 4%, antes de la crioprotección durante 24 horas en sacarosa al 30%. Se cortaron secciones coronales de 100 μm usando un micrótopo de deslizamiento, se montaron sobre portaobjetos de vidrio y se deslizaron usando Vectashield (Vector Laboratories, Inc.).

Registros de matriz de electrodos múltiples (MEA):

20 Inmediatamente después de los registros de electrofisiología *in vivo*, los ratones fueron sacrificados y enucleados. Los ojos se colocaron en una placa de Petri llena de aCSF carboxigenado (95% de $\text{CO}_2/5\%$ de CO_2) (fluido cefalorraquídeo artificial, concentración en mM: NaCl 118, NaHCO_3 25, NaH_2PO_4 1, KCl 3, MgCl_2 1, CaCl_2 2, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 10, L-Glutamina 0,5). Luego, las retinas se aislaron cuidadosamente con luz roja difusa bajo un microscopio de disección y se montaron, con células ganglionares hacia abajo, en una matriz de electrodos múltiples de 60 canales (Multi Channel Systems, Reutlingen, Alemania). Los explantes de retina se acoplaron en su lugar con una membrana de diálisis pesada y se perfundió continuamente con aCSF carboxigenado a razón de 2,2 mL por minuto utilizando una bomba peristáltica (SCI400, Watson Marlow, Reino Unido), y se mantuvo a 32 °C utilizando un controlador de temperatura Universal Serial Bus que regula un calentador en línea para la entrada de aCSF. Los estímulos de luz fueron proporcionados por una fuente generadora de luz personalizada (Lumencor, EE. UU.) para presentar la luz UV ($\lambda_{\text{máx}}$: 405 nm). A la intensidad más brillante, los LED emitían 15 Log fotones/ cm^2/s . Se usó una tarjeta de National Instruments (USB-6229) controlada por programas escritos en LabVIEW (versión 8.6, National Instruments, TX, EUA) para controlar la duración e intensidad del estímulo al alterar la salida del LED y ajustar la rueda del filtro que contiene filtros de densidad neutra (Cairn Research Limited). Los estímulos se administraron de acuerdo con un protocolo de luz como para los datos de electrofisiología *in vivo* descritos anteriormente. Los datos se muestrearon a una frecuencia de 25 kHz durante la adquisición de actividad espontánea y evocada y se registraron para el análisis fuera de línea.

Comportamiento

45 Actualmente, las tareas de discriminación visual comúnmente utilizadas requieren un entrenamiento extenso, entornos estresantes, o se basan en reflejos en lugar de un comportamiento orientado a objetivos. Para abordar estos déficits, se ha desarrollado un método simple de campo abierto para evaluar la visión basado en el comportamiento espontáneo. Mediante una modificación de la caja clara/oscura (dimensiones: longitud = 40 cm, ancho = 40 cm y altura = 30 cm, parte superior abierta), se permitió a los ratones moverse libremente entre dos zonas iguales (mitades este y oeste) a través de una abertura en la pared de separación. La caja estaba hecha de vidrio Perspex y sus paredes estaban pintadas de blanco a excepción de los dos lados largos de cada zona, que se mantenían despejados. Se colocaron dos lámparas infrarrojas idénticas en el centro sobre cada zona, para permitir la visualización en condiciones de oscuridad.

50 Los estímulos visuales se mostraron desde dos monitores de ordenador de pantalla plana de 17 pulgadas, frente a paredes transparentes de cada zona, usando un adaptador de pantalla múltiple externo DualHead2Go Digital Edition (Matrox Graphics Inc.). Esto permitió que tanto el estímulo de control como el de prueba se mostraran en monitores separados al mismo tiempo. Se mostraron una variedad de estímulos visuales, incluida una luz uniforme de campo completo (negro, gris y blanco), parpadeo de campo completo y una película naturalista. Estos estímulos se crearon utilizando un programa escrito personalizado que permitía la formación de dos estímulos diferentes en dos ventanas diferentes simultáneamente, al tiempo que conservaba la capacidad de operar ambos individualmente. El programa

permitió modificar los valores de los componentes blanco (255), negro (0) y gris (128) de los estímulos para lograr los niveles deseados de brillo y contraste.

Se realizaron experimentos de comportamiento en ratones de tipo silvestre (5), ratones rd1-CAG-GFP (n = 6), ratones rd1-CAG-hRho (n = 6) y rd1-grm6-hRho (n = 5). Antes del período experimental, los ratones fueron manipulados y habituados a su nuevo entorno durante 5 días, a la misma hora cada día, de la siguiente manera: los animales fueron llevados a la sala de pruebas en sus propias jaulas, colocados en la caja experimental y se les permitió moverse libremente con sus compañeros de camada durante 30 minutos.

Después del período de habituación, se llevaron a cabo experimentos de comportamiento durante varias semanas en una habitación completamente oscura a la misma hora cada día. A cada grupo de ratones se le permitió someterse a una sola condición de prueba por día. En cada día de prueba, los ratones fueron llevados a la sala de prueba en sus propias jaulas, se les permitió adaptarse a las condiciones de la sala de prueba durante 30 minutos y luego cada ratón se probó individualmente. Los ratones se colocaron en la caja de campo abierto (aleatoriamente a la mitad este u oeste) y se les permitió moverse libremente entre las dos zonas. Todos los ensayos de prueba se registraron en condiciones de infrarrojos a través de una videocámara equipada con un filtro de infrarrojos ($\lambda = 665 \text{ nm}$). La caja se limpió a fondo con etanol al 70% después de cada prueba de ensayo y se dejó secar al aire antes de colocar el siguiente ratón en la caja.

Una prueba de registro comenzó después de 3 minutos de habituación. Cada prueba consistió en 5 minutos de estímulo de control, después de lo cual se presentó un estímulo de prueba en una pantalla frente a una zona que contenía un ratón en ese momento. Para experimentos adaptados a la oscuridad, el estímulo de control consistió en 5 minutos en la oscuridad (pantallas encendidas en la oscuridad; radiancia = $0,004072 \text{ Wsr}^{-1} \text{ m}^{-2}$, irradiancia = $0,00132 \text{ W/m}^2$) seguido de 5 minutos en luz (pantalla blanca; radiancia = $0,06526 \text{ Wsr}^{-1} \text{ m}^{-2}$, irradiancia = $0,116 \text{ W/m}^2$) y luego 1 minuto nuevamente en la oscuridad. Para experimentos adaptados a la luz, el estímulo de control consistió en 5 minutos de luz de pantalla gris uniforme (pantalla gris; radiancia = $0,03342 \text{ Wsr}^{-1} \text{ m}^{-2}$, irradiancia = $0,0663 \text{ W/m}^2$), seguido de 5 minutos de parpadeo de campo completo (pantalla de parpadeo; radiancia = $0,03342 \text{ Wsr}^{-1} \text{ m}^{-2}$, irradiancia = $0,0663 \text{ W/m}^2$) seguido de 1 minuto en la luz uniforme. Para los experimentos de sensibilidad de contraste, las salidas de pantalla se ajustaron para permitir diferentes contrastes de prueba entre 2 zonas (contrastos de Michelson: 100%, 68,6%, 37,3%, 13,7% y 0% de contraste). Para el experimento de la película naturalista, el estímulo de control consistió en 5 minutos de luz gris uniforme, seguido de 1 minuto de presentación de la película y 1 minuto de regreso a la condición de control. La película (en color) presentaba un búho que se acerca.

Las pruebas registradas se almacenaron para análisis fuera de línea usando un dispositivo de software de seguimiento de video (EthoVision® XT 10.1 Noldus, Tracksys Ltd., Reino Unido). Se analizó la distancia recorrida por cada ratón en toda la caja y se mostraron los resultados en cajones de 30 segundos. La capacidad del ratón para ver los estímulos visuales se evaluó como un cambio en la actividad locomotora durante un período de transición de 1 minuto de un control al estímulo de prueba (es decir, se analizó la distancia recorrida en 30 segundos bajo la condición de control justo antes del estímulo de prueba, y la distancia recorrida en 30 segundos justo después del estímulo de prueba). La prueba t pareada de dos vías se usó para comparaciones dentro del mismo grupo de ratones antes y después de una presentación de estímulo de prueba durante un período de transición de 1 minuto.

En resumen, la introducción de Rodopsina humana en las células retinales internas de ratones que estaban ciegos debido a una degeneración retinal severa y pérdida de fotorreceptores de bastones y conos dio como resultado la restauración de la visión como lo demuestra una restauración en las respuestas de la pupila y las respuestas visuales en el cerebro (núcleo geniculado lateral) y la retina.

Discusión

En este estudio se ha demostrado que la expresión de la opsina del bastón humana puede otorgar sensibilidad a la luz a las retinas ciegas a través de un código visual diverso que involucra vías ENCENDIDA, APAGADA, transitoria y sostenida. Se observaron respuestas visuales robustas *in vitro* e *in vivo* bajo intensidades de luz equivalentes a la visión endógena de conos/PR y fueron capaces de controlar funciones sofisticadas del circuito retinal como la detección de contraste. Los ratones ciegos tratados mostraron actividad locomotora inducida por la luz restaurada bajo iluminación típica de ambientes interiores naturales y pudieron resolver el parpadeo de baja frecuencia en condiciones adaptadas a la luz. Además, con el tratamiento de opsina de bastones seleccionada, los ratones detectaron contrastes más bajos, pudieron resolver parpadeos de campo completo de mayor frecuencia y detectar escenas de películas naturalistas.

La introducción de canales y bombas de opsina microbianas y fotointerruptores químicos en las neuronas retinales sobrevivientes puede restaurar la sensibilidad a la luz. En el presente documento, la terapia génica se puede usar para administrar opsina de bastones humana a ratones ciegos. Sin embargo, uno de los principales desafíos en la terapia optogenética es lograr un nivel estable y efectivo de expresión de opsina en la retina a través de un método de administración clínicamente relevante. Los métodos actuales de administración viral requieren inyecciones subretinales invasivas donde la transducción se limita a una pequeña porción de la retina en el sitio de inyección. Se podría lograr una transducción más global mediante inyección en el vítreo, una técnica mucho más segura que se usa comúnmente en la práctica oftálmica de rutina. Sin embargo, las barreras físicas creadas por la matriz extracelular de las células de la retina limitan la transducción viral de esta ruta. Han surgido varios vectores de AAV mutantes novedosos (4YF y 7m8) con capacidad de penetrar más profundamente en el tejido retinal, pero actualmente requieren títulos virales muy altos (10^{14})

con inmunogenicidad potencialmente alta y efectos fuera del objetivo. En el presente enfoque, se ha utilizado la administración intravítrea del vector AAV2, que ya se ha demostrado que es seguro en ensayos clínicos. Además, se ha identificado una combinación de enzimas que se dirigen a las proteínas de la matriz extracelular que interrumpen las barreras físicas a las partículas virales que llegan a la retina desde el vítreo. La inyección conjunta de estas enzimas aumenta en gran medida el número y la propagación espacial de las neuronas infectadas por el virus.

En la retina intacta, la opsina de bastones de mamífero se encuentra normalmente en fotorreceptores de bastones especializados. Pertenece a una familia de receptores acoplados a proteína G (GPCR) que funciona a través de señalización de compuestos intermedios en cascada. En la fotoactivación, la opsina de bastones se acopla a la transducina (Gt; un miembro de la subfamilia Gi/o) para la transducción de señales visuales (Palczewski, KG Annu. Rev. Biochem. (2006) 75, 743-767 *in vivo*, que conduce a un aumento de las corrientes de K⁺, hiperpolarización de la membrana e inhibición de la liberación de neurotransmisores. Un signo que invierte la sinapsis entre los fotorreceptores y sus neuronas de segundo orden, células bipolares, convierte esta respuesta inhibitoria en una señal eléctrica positiva que se transmite a través de las células ganglionares al cerebro para obtener percepciones visuales.

Los canales de opsina (ChR) y las bombas (HaloR) se han expresado funcionalmente en la retina ciega que conduce a la despolarización y la hiperpolarización, respectivamente. Además, la opsina de bastones de vertebrados se ha expresado en cultivo celular e *in vivo* fuera de la retina (células de Purkinje cerebelosas) y se demostró que inhibe la excitabilidad neuronal cuando se activa por luz (Li X, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 6 de diciembre de 2005 ; 102 (49): 17816-21; Gutierrez DV, et al., J Biol Chem. 22 de julio de 2011; 286 (29): 25848-58). Sin embargo, ahora se sabe que una opsina de bastones similar a GPCR podría funcionar fuera de los fotorreceptores nativos cuando se expresa directamente en neuronas de segundo o tercer orden (RGC) y ejerce su acción inhibitoria para producir una señal visual. Se razonó que en las retinas ciegas, desacopladas de la entrada normal de fotorreceptores, hay un aumento general en la actividad basal de las neuronas de salida sobrevivientes y que la opsina de bastones podría actuar para suprimir esta "hiperactivación" y mejorar la relación señal/ruido para apoyar la discriminación visual.

En el presente documento, se muestra que la opsina de bastones ectópica puede expresarse en las células retinales internas y funcionar fuera de los fotorreceptores nativos. De hecho, como se predijo, se observó que las respuestas inhibitorias de APAGADO *in vivo* (la velocidad de activación disminuye con la estimulación de la luz ENCENDIDA) tanto en los tratamientos con opsina de bastones dirigidos (35,7% de todas las respuestas a la luz) y no dirigidos (10,8%). Estos no se ven normalmente con las respuestas WT y tampoco se observaron tales respuestas en las preparaciones *in vitro*. Sin embargo, sorprendentemente, se encontraron muchas "respuestas de ENCENDIDO" positivas tanto *in vitro* como *in vivo*. De hecho, se encontró un conjunto diverso de respuestas con tratamientos no dirigidos y dirigidos, incluyendo respuestas sostenidas de ENCENDIDO, transitorias de ENCENDIDO y excitatorias de APAGADO (la velocidad de activación aumenta con la luz APAGADA), así como señales inhibitorias de APAGADO *in vivo*. Además, se observó un pequeño número de respuestas de ENCENDIDO-APAGADO *in vivo* con tratamiento no dirigido. Esto sugeriría que la opsina de bastones puede modular el comportamiento celular en forma dependiente de la luz tanto despolarizante como hiperpolarizante. Esto sugeriría que la expresión de la opsina de bastones en las células bipolares de ENCENDIDOS es lo suficientemente fuerte como para activar neuronas postsinápticas de tercer orden y estimular bucles inhibitorios amacrinicos (todas las células) que conducen a la activación de las células bipolares de APAGADOS y, por lo tanto, a la doble inhibición o respuestas excitatorias de ENCENDIDO.

En sistemas intactos, la información visual se procesa a través de dos rutas paralelas, la ruta de ENCENDIDO y la ruta de APAGADO. En la ruta de ENCENDIDO, las células responden a los incrementos de luz, mientras que en la ruta de APAGADO las células responden a los decrementos de luz. La restauración de las rutas de ENCENDIDO y APAGADO en retinas ciegas es compatible con otros estudios que previamente han dirigido específicamente ChR y LiGluR a células BP de ENCENDIDO. Sin embargo, estudios previos que utilizan promotores ubicuos (Lin B, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 14 de octubre de 2008; 105 (41): 16009-14) o que se dirigen específicamente a RGC solamente, han reportado señales electrofisiológicamente más uniformes (por ejemplo, sostenidas de ENCENDIDOS con melanopsina ectópica) y sin restauración simultánea de las rutas de ENCENDIDO y APAGADO (ChR en RGC condujo solo a las rutas de ENCENDIDO, mientras que HaloR en RGC solamente a las rutas de APAGADO). Es posible que la expresión en las RGC solamente no fuera lo suficientemente fuerte como para activar directamente las entradas excitatorias e inhibitorias normales a las células. Además, en este caso, incluso con el tratamiento no dirigido, se encontró que la expresión de opsina de bastones en las células INL (probablemente células BP), podría explicar la activación secundaria de todo el bucle y la disección de las respuestas tanto en señales inhibitorias como excitatorias.

Una de las principales ventajas de usar la opsina de bastones como una herramienta optogenética para restaurar la visión radica en su simplicidad para proporcionar fotorrecepción autónoma con su capacidad de usar cromóforo endógeno (retinal o cis-retinaldehído) como el fotointerruptor natural. Sin embargo, para las respuestas visuales, la opsina de bastones requiere un reciclaje constante de la retina, que normalmente se blanquea con la luz. Se cree que este reciclaje depende del contacto íntimo entre los bastones y el RPE. De hecho, de acuerdo con estudios previos (Li X, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 6 de diciembre de 2005; 102 (49): 17816-21; Gutiérrez DV, et al., J Biol Chem. 22 de julio de 2011; 286 (29): 25848-58), se descubrió que la opsina de bastones *in vitro* se blanquea fácilmente después de la estimulación con luz y requiere un suministro constante y exógeno de cromóforo (9-cis retinal) para mantener las respuestas dependientes de la luz. Sin embargo, *in vivo* no se encontró que el blanqueo sea un problema significativo. Es importante destacar que muchas respuestas a la luz fueron robustas y repetibles en múltiples ensayos. Por lo tanto, es probable que la retina degenerativa proporcione un buen suministro endógeno de retinal, y en ausencia de fotorreceptores que

normalmente lo absorben, la opsina de bastones en las células retinales internas tiene acceso al cromóforo reciclado por las células RPE o de Muller para producir respuestas visuales. Otro aspecto importante de la terapia con opsina de bastones es su capacidad de funcionar en condiciones de luz fisiológica, a diferencia de las estrategias actuales basadas en opsinas microbianas y fotointerruptores sintéticos que requieren intensidades de luz extremadamente altas para la activación. Se encontró que la función de los tipos de células transitorias y sostenidas de ENCENDIDO y APAGADO, *in vivo* bajo un intervalo dinámico de intensidades de luz probadas (10^{13} - 10^{15} fotones/cm²/s) caen bajo un intervalo de sensibilidad del cono endógeno. Estudios reportados previamente utilizaron intensidades de luz mucho más altas para la activación: LiGluR > $1,7 \times 10^{17}$ fotones/cm²/s (Gaub BM, et al., Proc Natl Acad Sci US A. 23 de diciembre de 2014; 111 (51): E5574-83), ChR > 3×10^{15} - 10^{17} fotones/cm²/s (Lagali PS, et al., 2008, Nat Neurosci. 11 de junio de 2008; 11 (6): 667-75); HaloR en RGC > $5,1 \times 10^{18}$ fotones/cm²/s (Zhang Y, et al., J Neurosci. 22 de julio de 2009; 29 (29): 9186-96) y HaloR en segmentos internos de cono > 10^{16} fotones/cm²/s (Busskamp V, et al., 2010, Science. 23 de Julio de 2010; 329 (5990): 413-7). La sensibilidad es un factor de los mecanismos intracelulares y los datos sugieren que la opsina de bastones puede funcionar a través de la cascada de amplificación de luz de GPCR bajo intensidades de luz baja. Esto contrasta con los canales de iones microbianos (ChR2), bombas (HaloR) o fotointerruptores (LiGluR), que no pueden amplificar las señales a nivel de proteína.

La caracterización adicional de la cinética de las respuestas restauradas *in vivo* mostró que el inicio, la compensación y la duración de la respuesta a la luz variaron entre los tipos de células para los enfoques no dirigidos y dirigidos. Se encontró que las respuestas de latencias variadas, algunas rápidas, algunos más lentas, consistentes con estudios previos (Caporale N, et al., 2011, Mol Ther. Julio de 2011; 19 (7): 1212-9; Gaub BM, et al., 2014, Proc Natl Acad Sci USA. 23 de diciembre de 2014; 111 (51): E5574-83). El interruptor de luz de opsina de bastones es intrínsecamente rápido y las respuestas de luz más lentas pueden ser un efecto de la dinámica de la cascada de señalización intracelular y dependen de la opsina de bastones que expresa el tipo de célula nativa. Además, es probable que el inicio de respuesta más lento se deba a la entrada de luz no saturada y al menor nivel de expresión de la opsina de bastones en algunas células. (Algunas respuestas rápidas de opsina de bastones pueden ser a través de la cinética rápida de la cascada nativa del receptor mgluR6 en las células BP de ENCENDIDO).

El ojo es sensible en una amplia gama de intensidades de luz desde la visión escotópica (nocturna) a la fotópica (diurna). Esta sensibilidad se puede medir mediante la intensidad de umbral mínima necesaria para evocar la visión. Uno de los aspectos importantes de esta visión es la rapidez con que el ojo recupera su sensibilidad en la oscuridad después de exposiciones a luz brillante (adaptación oscura) o, lo que es más importante, qué tan rápido se adapta a la iluminación de fondo para poder discriminar objetos en este fondo (adaptación a la luz). Hasta ahora, la mayoría de los estudios optogenéticos han estudiado estímulos visuales simples que involucran pasos de luz desde la oscuridad. Este es un escenario poco natural y en el mundo real los objetos tienen contraste, que es constante e independiente de la luminancia ambiental. Por lo tanto, se cuestionó si la opsina de bastones ectópica podría funcionar bajo condiciones adaptadas a la luz y conservar el código visual restaurado contra cambios en la irradiancia. De hecho, se encontraron respuestas dLGN robustas después de incrementos de presentaciones de estímulo de luz de prueba contra una iluminación de fondo. (Es posible que la segregación robusta observada en las rutas de ENCENDIDO y APAGADO pueda facilitar esta adaptación de luz y mejorar la sensibilidad al contraste). Se investigó tanto la expresión no dirigida como dirigida. Primero, un enfoque no selectivo y no dirigido con un fuerte promotor pan-neuronal, CAG se utilizó para administrar genes a través de la retina interna sobreviviente. No se sabía qué neuronas, si las hubiera, expresarían la opsina de bastones y si se expresarían en un tipo particular de neurona más que en la otra o si tienen preferencia por la ruta de ENCENDIDO o APAGADO o al objetivo por igual. Se esperaba que el desequilibrio en la expresión entre las rutas de ENCENDIDO y APAGADO significaría que, aunque algunas señales se cancelarían entre sí, habría un aumento general en la información visual transmitida al cerebro. La ventaja de este enfoque también significaría que las células ganglionares de la retina, que sobreviven más tiempo (Mazzoni F, J Neurosci 28 (52): 14282-14292), también se seleccionan y este enfoque puede usarse en la degeneración tardía donde las células bipolares se ven comprometidas (cronin). En segundo lugar, se probó si restringir la expresión solo a la ruta de 'ENCENDIDO' conduciría a una mejora en la señal visual tanto electrofisiológica como conductualmente. La opsina de bastones se dirigió específicamente a las células bipolares de ENCENDIDO de la retina utilizando un promotor específico de células mínimo Grm6 (Masu M et al., Cell 1995).

Se observó una notable similitud electrofisiológica entre los tratamientos con opsina de bastones no dirigida y dirigida. El código recuperado era igualmente complejo y diverso. La cinética de respuesta, la sensibilidad y la respuesta de contraste fueron similares para los dos tratamientos. Curiosamente, el tratamiento dirigido condujo a más respuestas de APAGADO (principalmente inhibitorias de APAGADO).

Sin embargo, hubo diferencias importantes en el comportamiento. Primero, se observaron diferencias en la restauración de la función visual simple, PLR. La opsina de bastones expresada de forma no selectiva restauró el accionamiento a la ruta de RGC que media el PLR hasta cerca del nivel de WT. Esto es consistente con melanopsina y LiGluR de primera generación en RGC, que conducen a una restauración casi completa (Lin B, Proc Natl Acad Sci US A. Oct 14 de 2008; 105 (41): 16009-14) o parcial (Caporale N, et al. 2011, Mol Ther. Julio de 2011; 19 (7): 1212-9) de PLR. Curiosamente, cuando la expresión se restringió a las células BP de ENCENDIDO, esta ruta se mantuvo en gran medida afectada. Es posible que la expresión no dirigida de la opsina de bastones activara directamente los ipRGC (acoplamiento a la cascada Gs/Gq) que conducen a la estimulación, mientras que la expresión selectiva en las células BP de ENCENDIDO evitaron la activación directa de la ruta y la recuperación de este reflejo no visual.

¿Qué pasa con las rutas de formación de imágenes? ¿Se puede utilizar este código visual que se creó para mejorar la

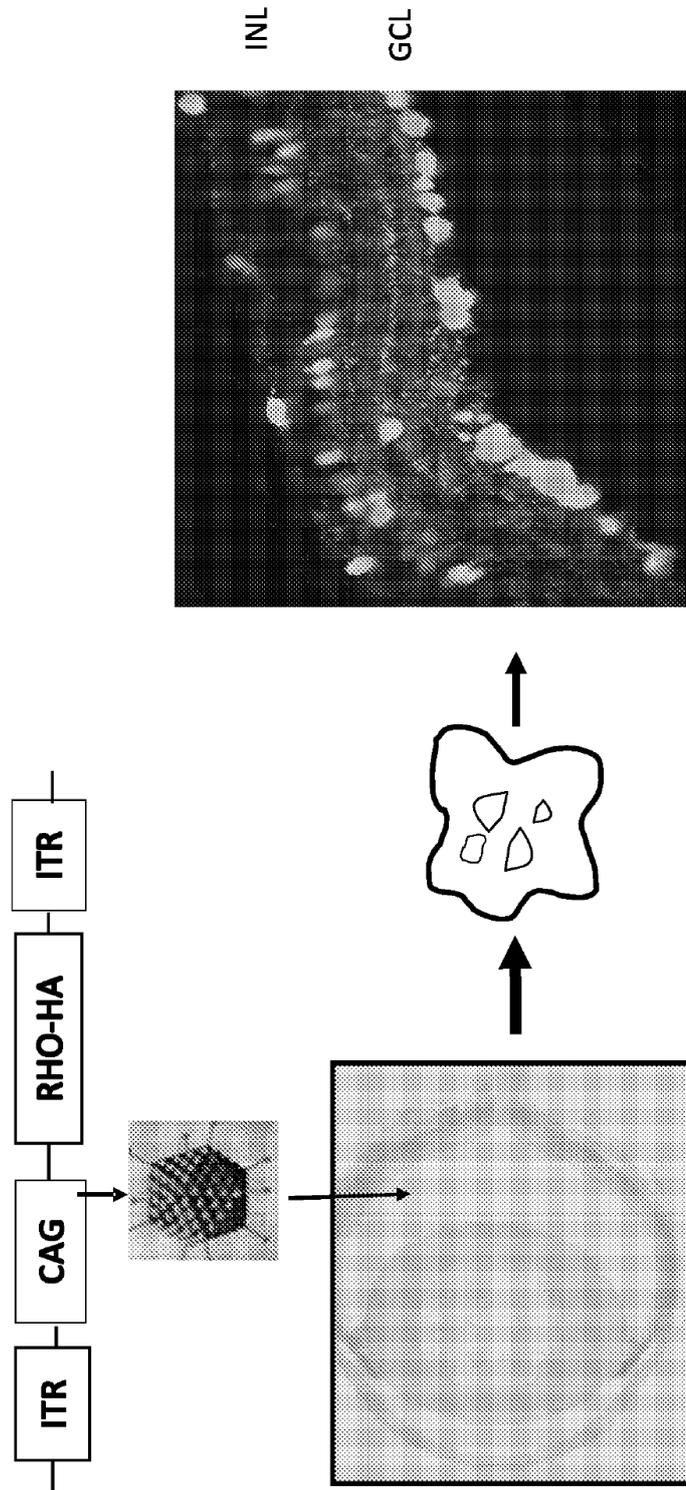
visión de formación de imágenes bajo niveles fisiológicos de luz? Una de las ventajas de apuntar específicamente a las neuronas retinales más distales sería preservar el procesamiento interno de la retina, ajustar las respuestas restauradas en señales más coherentes y lograr una visión de mejor calidad. Hasta ahora, los estudios optogenéticos han abordado tareas visuales simples que involucran la discriminación oscuridad - luz y ninguno ha reportado si el sistema podría rastrear los cambios contra una iluminación de fondo o en respuesta a escenas naturalistas. Se descubrió que las respuestas *in vivo* restauradas podrían soportar una simple discriminación de oscuridad - luz con ambos tratamientos bajo iluminación equivalente a la iluminación interior. Además, los ratones tratados con un tratamiento con opsina de bastones no dirigida y dirigida podrían resolver el parpadeo de la luz completa archivada a 2 Hz contra una iluminación de fondo uniforme. Además, se descubrió que los ratones con tratamiento dirigido resolvieron parpadeos de mayor frecuencia, incluidos 4 Hz y 10 Hz contra una iluminación de fondo uniforme. Además, los ratones con expresión específica de opsina de bastones en células BP de ENCENDIDO pudieron detectar el parpadeo a 4 Hz a un nivel de contraste más bajo contra la iluminación de fondo (contraste de Michelson 66,7%). Los humanos sobresalen en el procesamiento de escenas visuales naturales. A pesar del cambio constante de las escenas visuales, nuestro cerebro puede transformar patrones complejos de luz que caen sobre nuestra retina y extraer información relevante en una percepción coherente en unos pocos cientos de milisegundos. Con el potencial de traducción en mente, se cuestionó si la opsina de bastones ectópica podría generar señales lo suficientemente robustas como para preservar muchos niveles de procesamiento visual creando un código visual que los ratones podrían usar para rastrear modulaciones espacio-temporales naturales en la intensidad de la luz a niveles típicos de iluminación interior. Electrofisiológicamente, con ambos tratamientos, se estableció que la identificación de neuronas individuales pueden rastrear los cambios en los niveles de luz a lo largo del espacio y el tiempo que ocurren en escenas de películas naturales. Esto sugeriría que el sistema visual (con su plasticidad) es capaz de explotar respuestas restauradas agrupadas temporal y espacialmente que transportan información simple sobre señales de ENCENDIDO y APAGADO y contraste para procesar escenas naturales reales. Además, se descubrió que los ratones que recibieron tratamiento con opsina de bastones aumentaron su comportamiento locomotor en respuesta a escenas de películas naturales. Esto sugeriría que la calidad de la visión perceptiva mejora con el tratamiento dirigido en comparación con el no dirigido tal vez debido a una convergencia de señal más coherente de las células bipolares a las RGC necesarias para una discriminación temporoespacial más compleja.

En resumen, los resultados muestran que la opsina humana de bastones en las neuronas retinales internas supervivientes es una estrategia prometedora para restaurar la visión en la degeneración retinal debido a la pérdida de fotorreceptores y revertir las etapas avanzadas de ceguera. Como proteína humana, ofrece ventajas sobre las terapias actuales basadas en microorganismos en términos de cuestiones éticas y de seguridad. Proporciona una estrategia fotorreceptiva autónoma que amplifica la señal a través de la cascada intracelular y puede impartir una sensibilidad mejorada en comparación con las estrategias optogenéticas actuales. Cuando se expresa ectópicamente en las neuronas de la retina interna, genera un código visual diverso basado en las respuestas de ENCENDIDO y APAGADO capaces de rastrear los cambios en las intensidades de luz sobre la iluminación de fondo y en escenas de películas naturales. Con respecto al comportamiento, los ratones ciegos tratados son capaces de discriminar la oscuridad y la luz y pueden resolver el parpadeo de campo completo de 2 Hz en condiciones de luz adaptadas a la iluminación típica de la iluminación interior. Además, restringir la expresión a las células BP de ENCENDIDO, condujo a mejoras en las percepciones visuales *in vivo* y los ratones tratados pudieron resolver parpadeos de mayor frecuencia, detectar menor contraste y resolver escenas naturales.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de una enfermedad degenerativa de la retina, en la que la composición terapéutica comprende un vector de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana, en el que el vector comprende un promotor operativamente unido al ácido nucleico en el que el promotor dirige la expresión ubicua o específica de neuronas en las células retinales internas, y en la que las células retinales internas comprenden células bipolares de ENCENDIDO o células bipolares de APAGADO.
2. Una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de enfermedad degenerativa de la retina de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición es un líquido inyectable.
- 10 3. Una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de la enfermedad degenerativa de la retina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que el método comprende introducir una secuencia de ácido nucleico mediante una inyección subretinal o intravítrea.
- 15 4. Una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de la enfermedad degenerativa de la retina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el promotor es específico para la expresión en células bipolares de ENCENDIDO o APAGADO.
- 20 5. Una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de la enfermedad degenerativa de la retina de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el promotor se selecciona del grupo que consiste en L7, thy-1, recoverina, calbindina, GAD-67, Grm6 y proteína de fusión potenciadora de Grm6-SV40.
6. Una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de la enfermedad degenerativa de la retina de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el promotor es el promotor específico de células Grm6-SV40 para el direccionamiento selectivo de células bipolares de ENCENDIDO.
7. Una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de enfermedad degenerativa de la retina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el método comprende aumentar o restaurar la función fotorreceptora de una retina y/o restaurar la visión de un sujeto.
- 25 8. Una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de la enfermedad degenerativa de la retina de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la condición degenerativa de la retina se selecciona del grupo que consiste en una distrofia retinal que incluye una distrofia de bastones, una distrofia de bastones y conos, una distrofia de conos y bastones, una distrofia de conos y una distrofia macular; otra forma de degeneración retinal o macular; una condición isquémica; uveítis; edema; y cualquier otra enfermedad resultante de la pérdida de la capacidad de los fotorreceptores.
- 30 9. Una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de enfermedad degenerativa de la retina de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotorreceptora humana se selecciona del grupo que consiste en Rodopsina humana o una fotopsina.
- 35 10. Una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de la enfermedad degenerativa de la retina de acuerdo con la reivindicación 9, en la que se selecciona una fotopsina del grupo que consiste en opsina sensible a la longitud de onda larga (OPN1LW), opsina sensible a la longitud de onda media (OPN1MW) y opsina sensible a la longitud de onda corta OPN1SW).
- 40 11. Una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de la enfermedad degenerativa de la retina de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la secuencia de ácido nucleico comprende i) el gen de la rodopsina (RHO) (GenBank: BC111451.3, acceso NM_000539, versión NM_000539.3 GI: 169808383), o un fragmento o derivado del mismo, o ii) la opsina 1 de conos de Homo sapiens, el gen OPN1LW sensible a onda larga (secuencia de referencia del NCBI: acceso: NM_020061, versión NM_020061.5), o un fragmento o derivado del mismo; o iii) la opsina 1 de conos Homo sapiens: OPN1 MW sensible a onda media, (Secuencia de referencia del NCBI: acceso: NM_000513, versión NM_000513.2, o un fragmento o derivado del mismo; o iv) la opsina 1 de conos Homo sapiens, sensible a onda corta (OPN1SW) NM_001708, versión NM_001708.2, o un fragmento o derivado del mismo, en la que el fragmento o derivado del mismo retiene al menos 70% de la función fotosensible de la proteína fotosensible nativa.
- 45 12. Una composición terapéutica para usar en un método de tratamiento de la enfermedad degenerativa de la retina de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína fotosensible se proporciona como un vector, preferiblemente un vector viral, preferiblemente un vector AAV, preferiblemente un vector de serotipo 2 o un vector AAV modificado, por ejemplo AAV 4YF o AAV 7m8.
- 50 13. Un kit que comprende una composición terapéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende además instrucciones de uso, un régimen de dosificación, una o más agujas finas, una o más jeringas y disolvente.

Figura 1



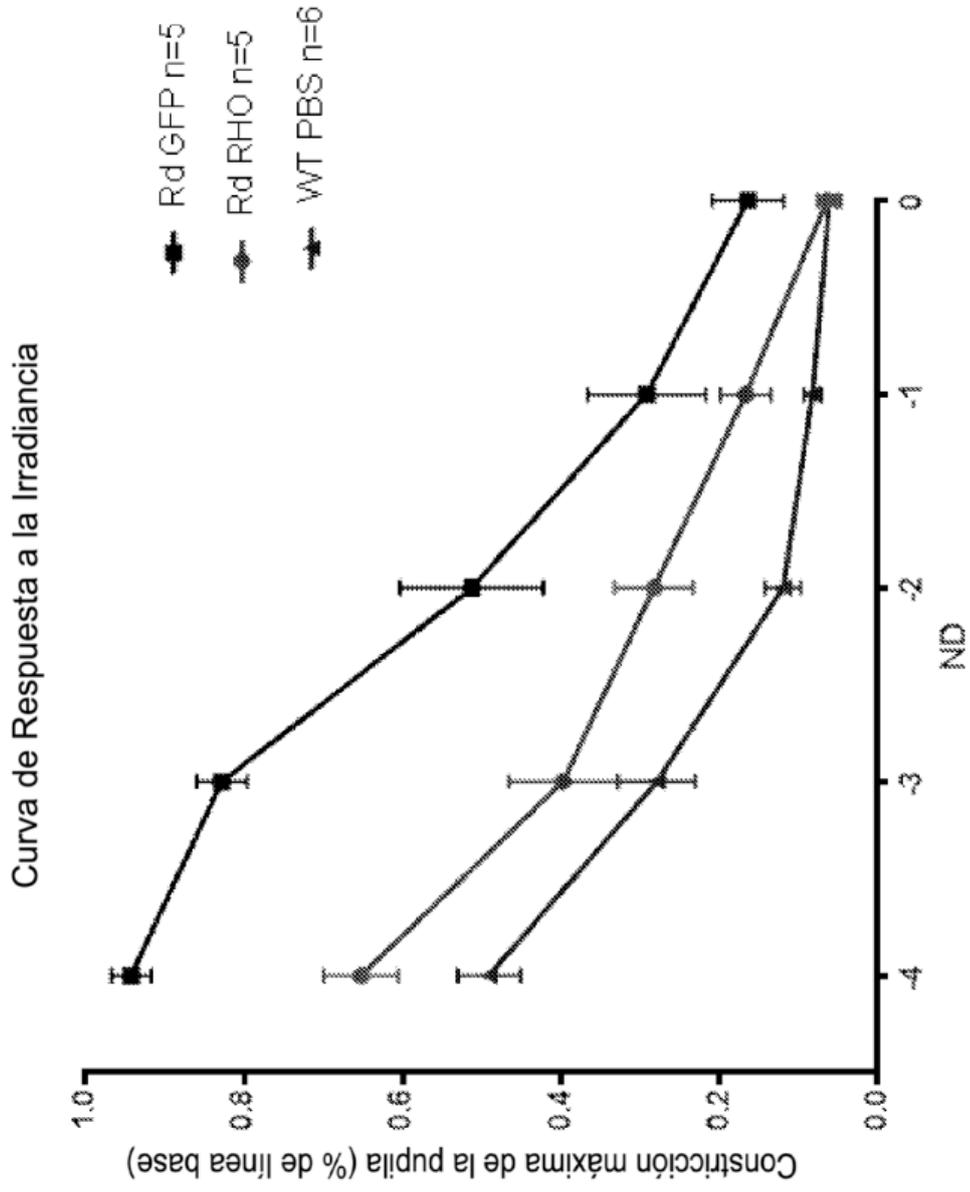


Figura 2

Figura 3 A) ND2

Histogramas de Perievento, referencia = derecho, cajón = 200 ms

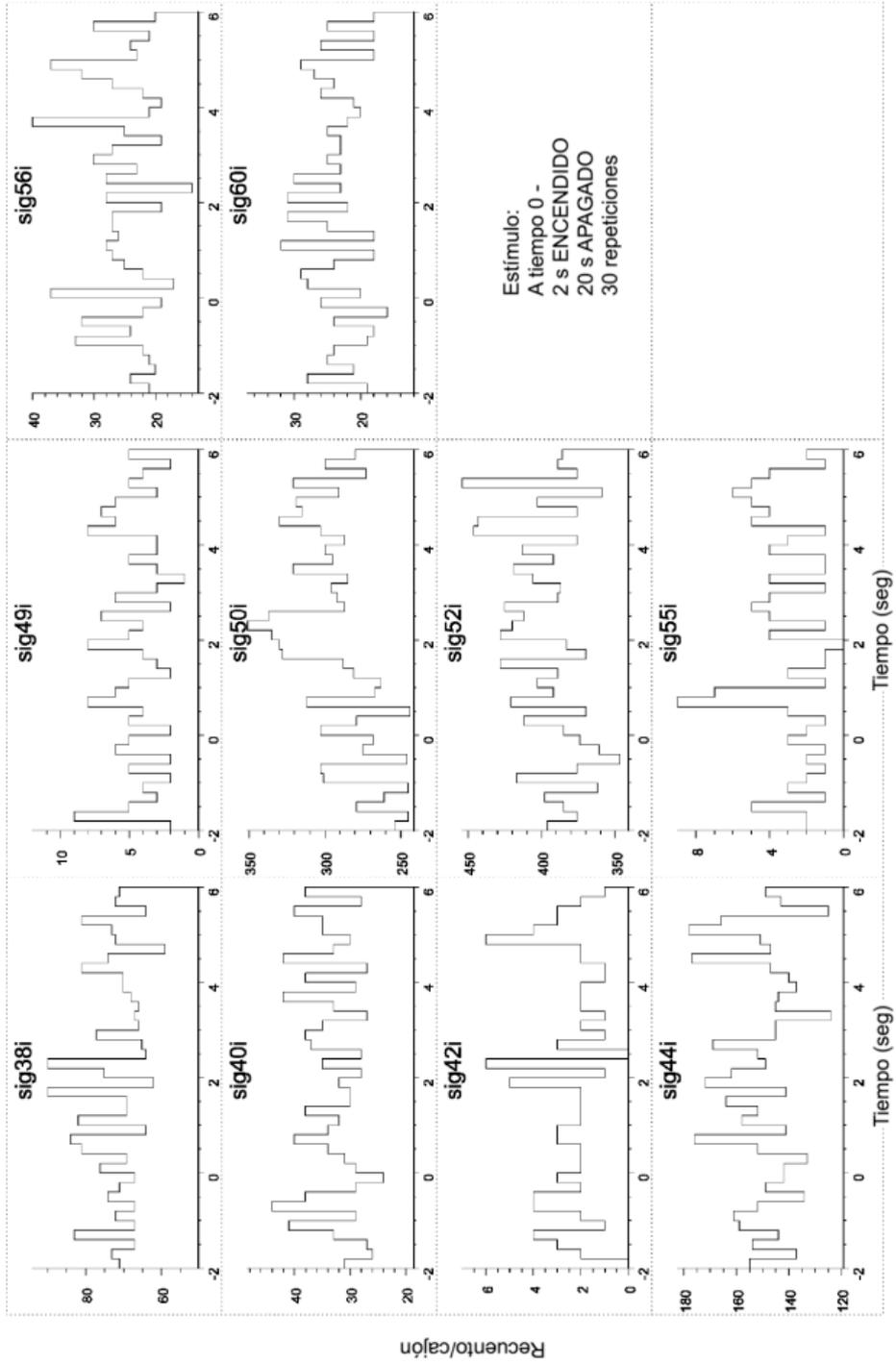


Figura 3 B) ND1

Histogramas de Perievento, referencia = derecho, cajón = 200 ms

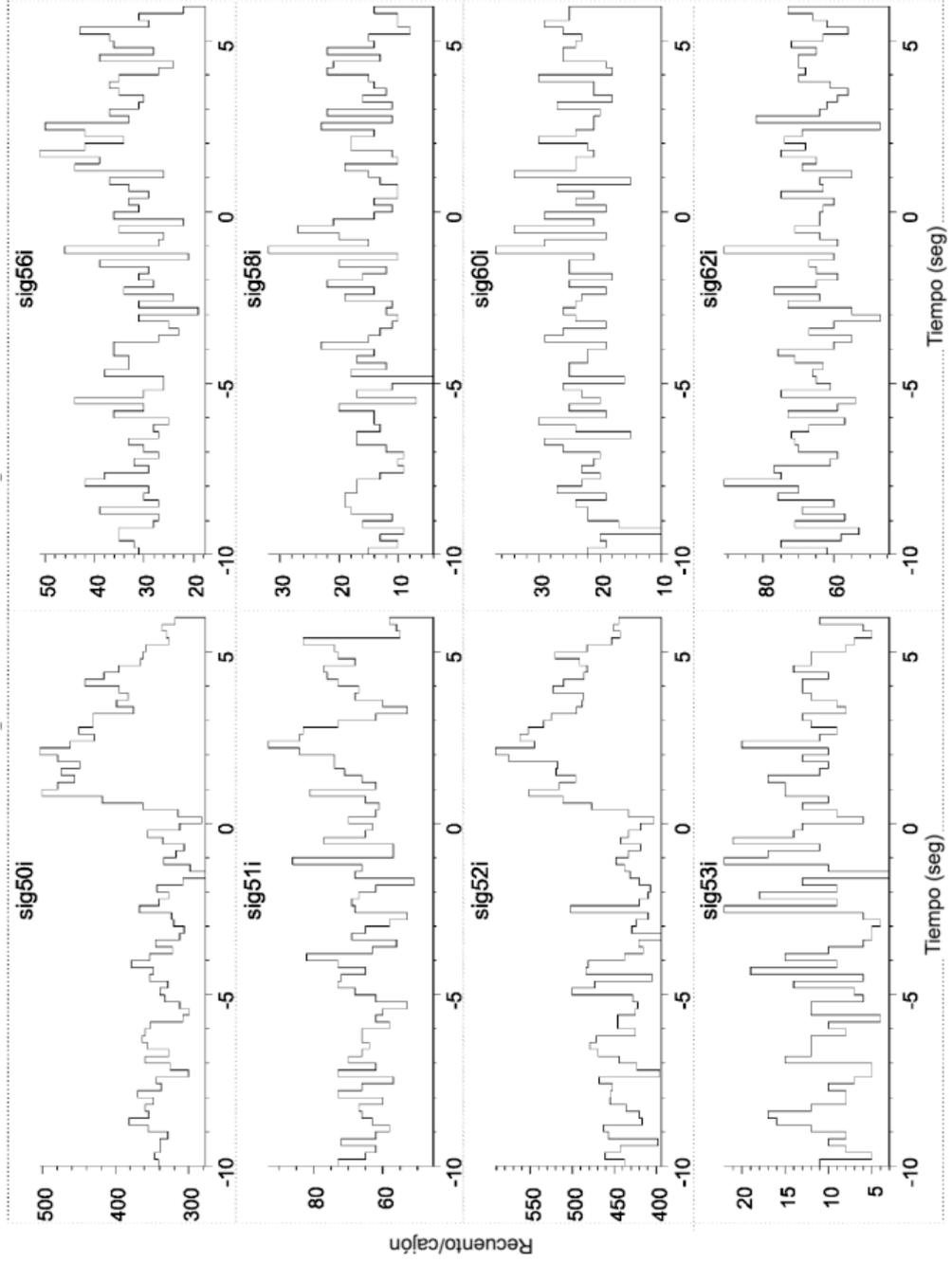


Figura 3 C) NDO

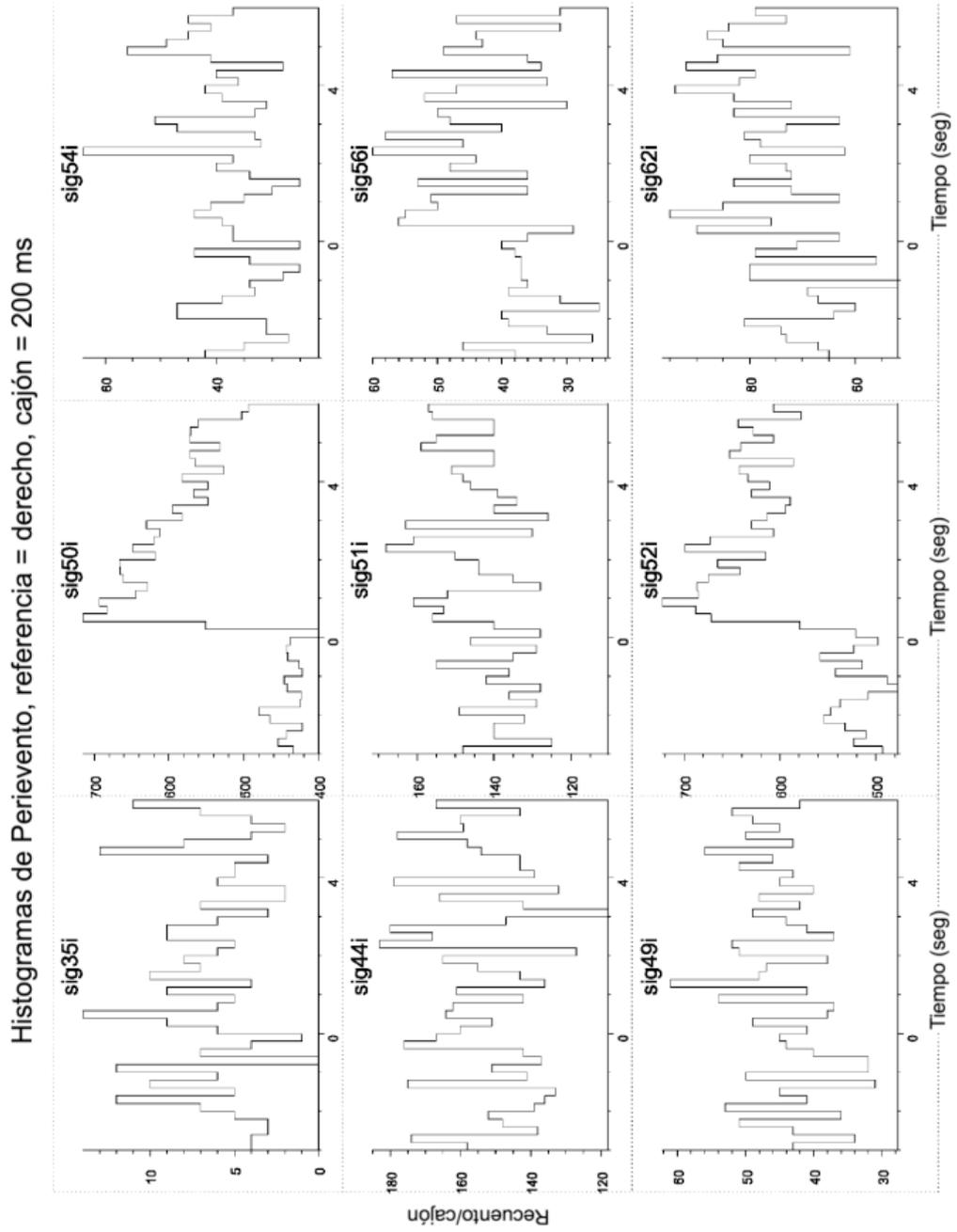


Figura 3 D)

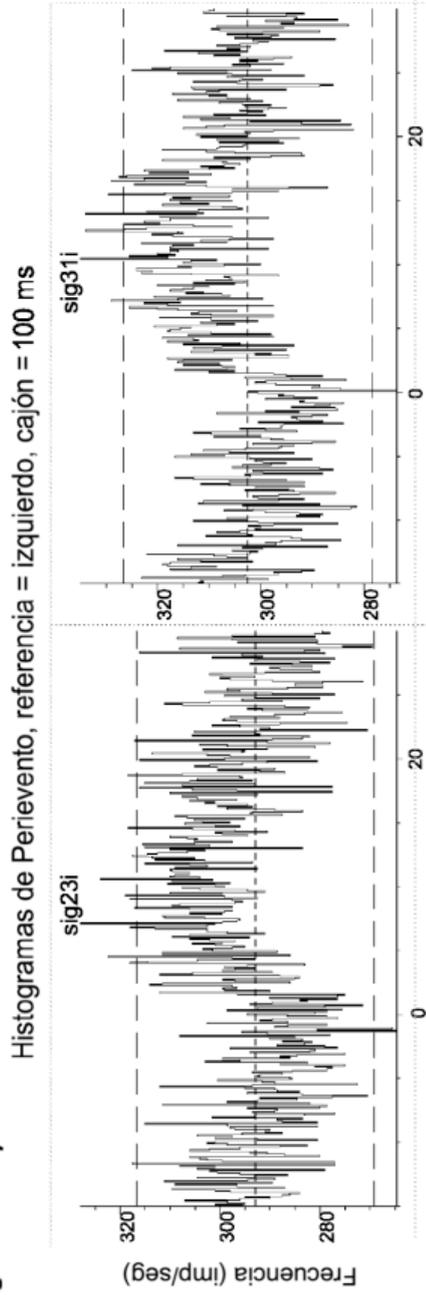
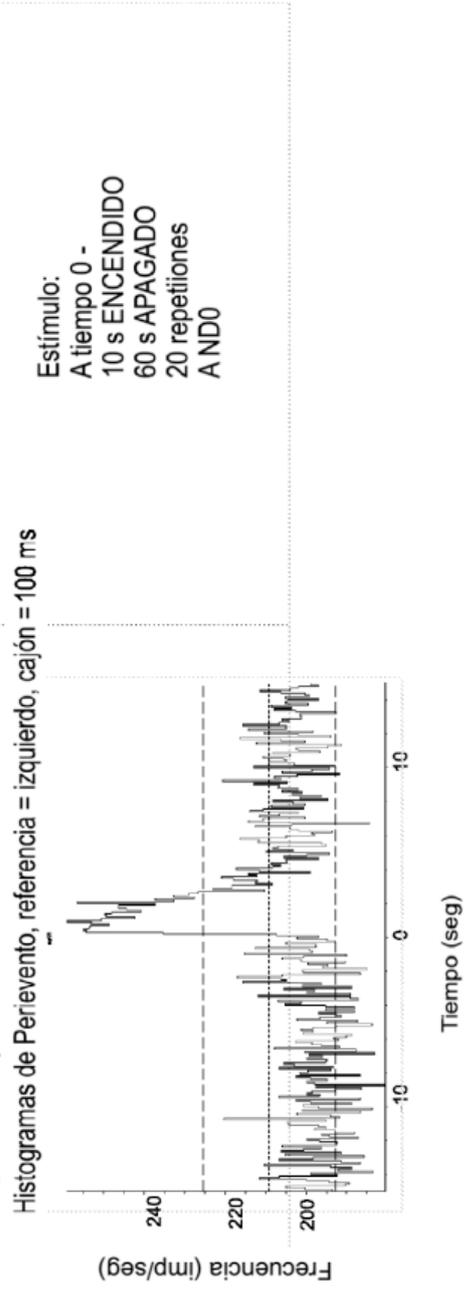


Figura 3 E)



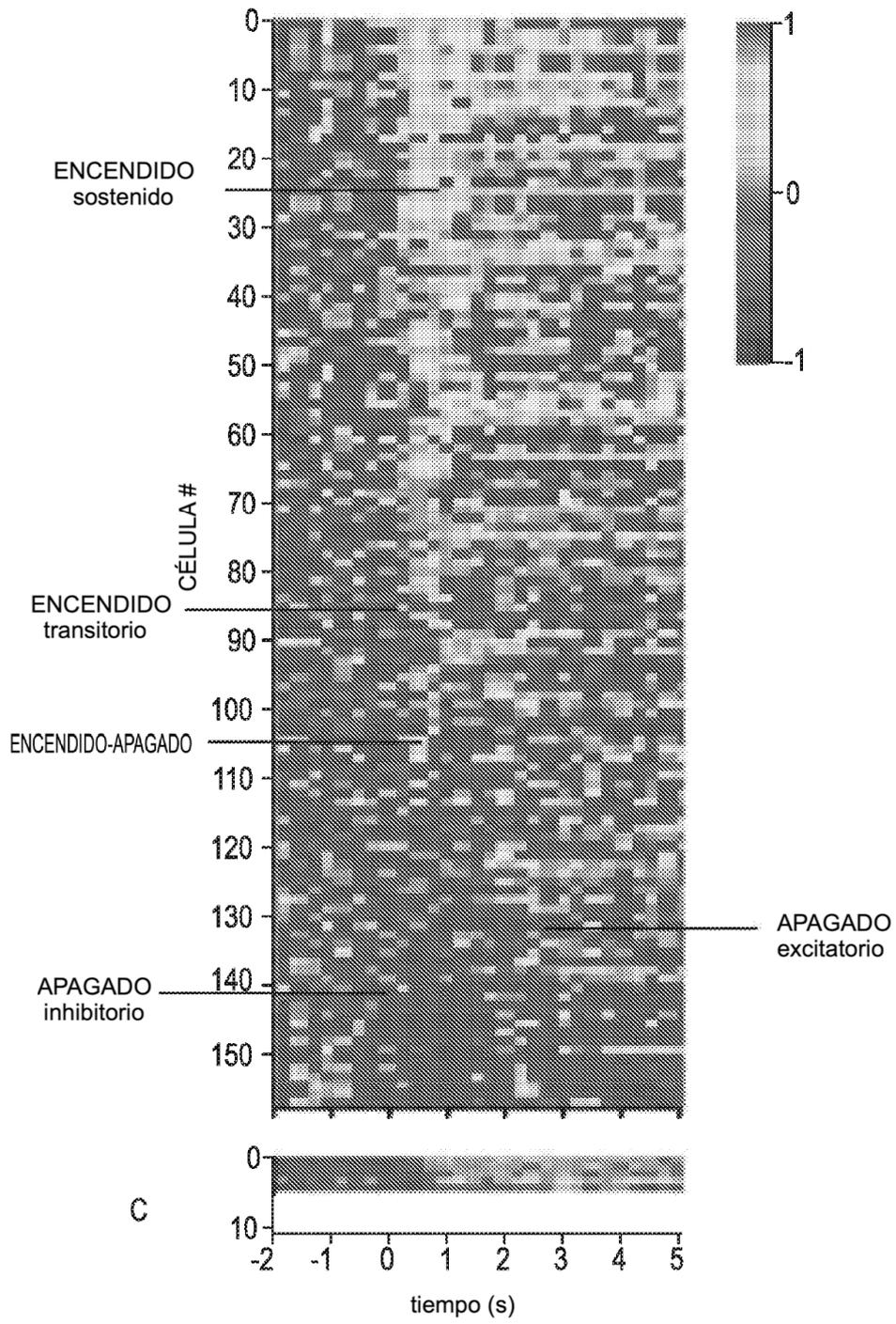


Fig. 3F

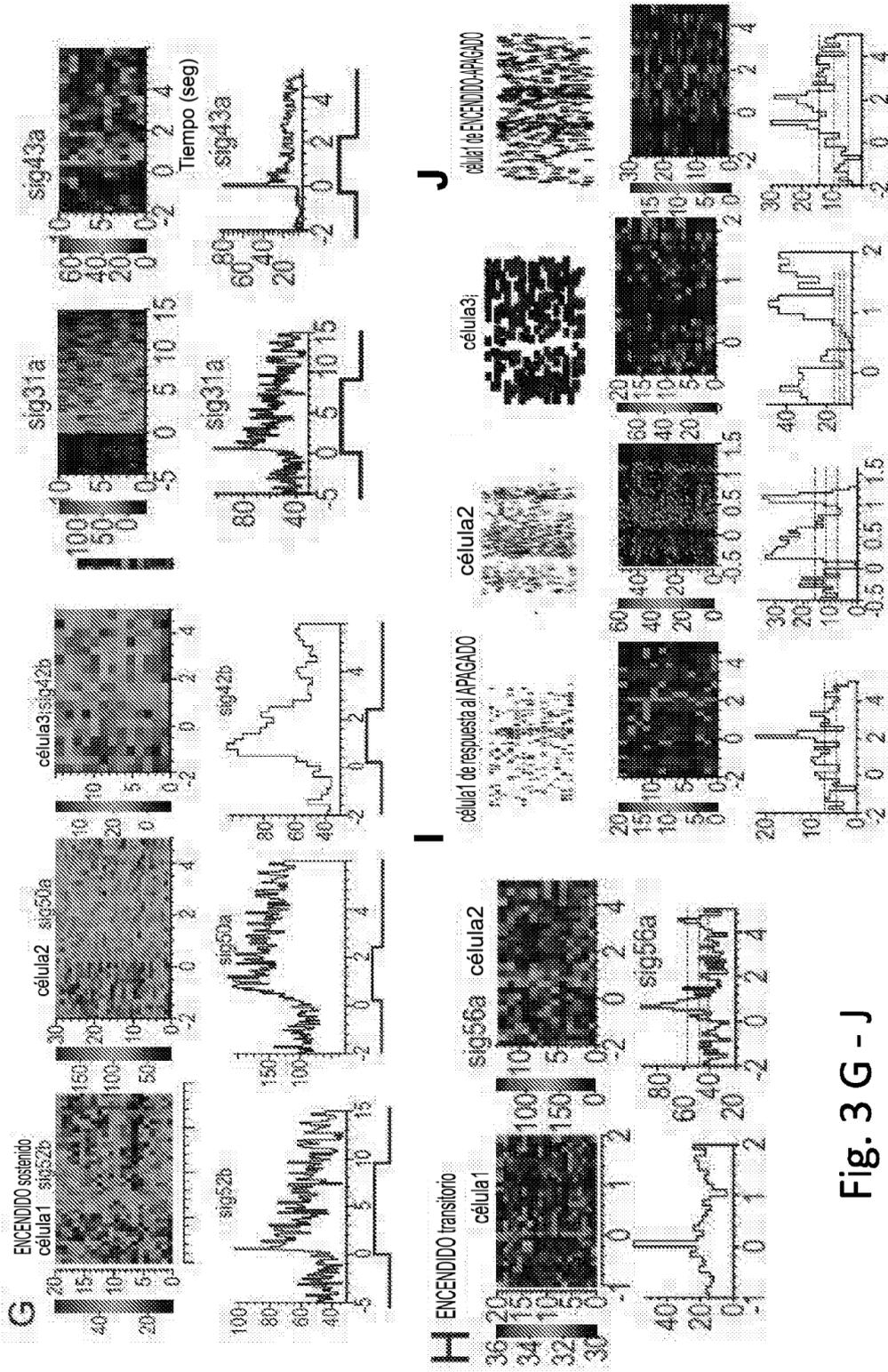


Fig. 3 G - J

Figura 4 A) ND2

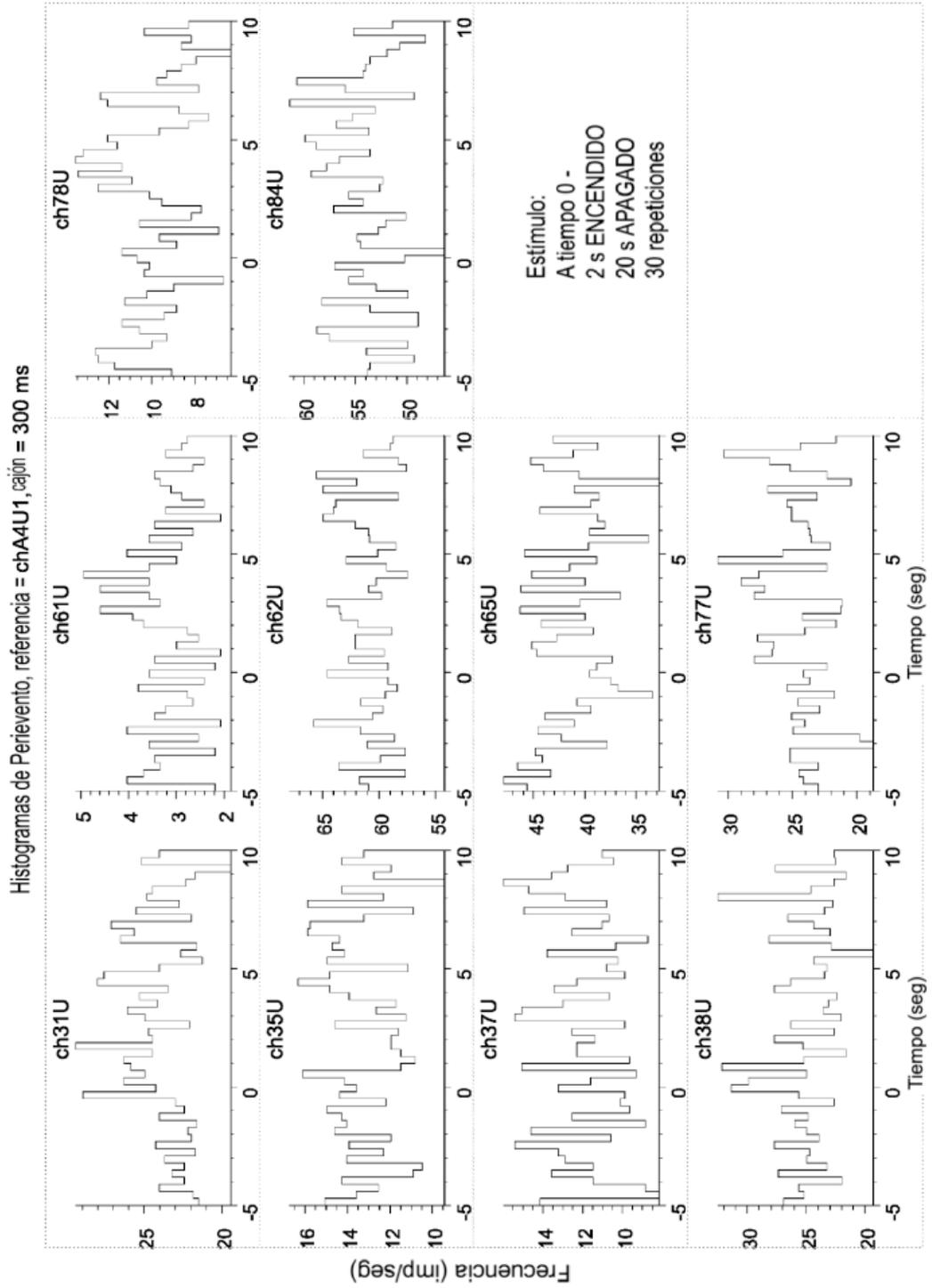
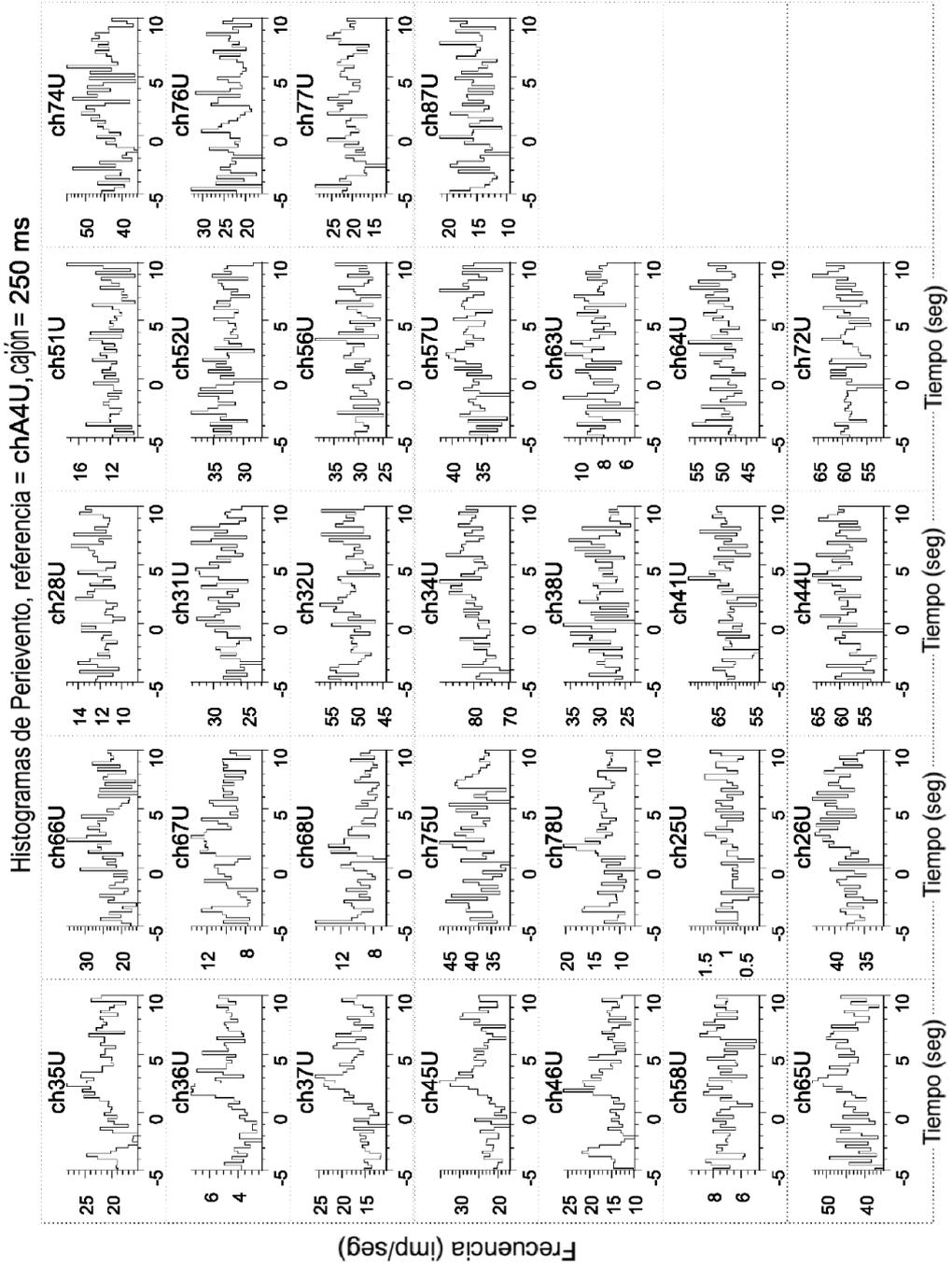


Figura 4 C) NDO



Estímulo:
 A tiempo 0 -
 10 s ENCENDIDO
 60 s APAGADO
 20 repeticiones
 A ND0

Histogramas de Perievento, referencia = Mel, cajón = 300 ms

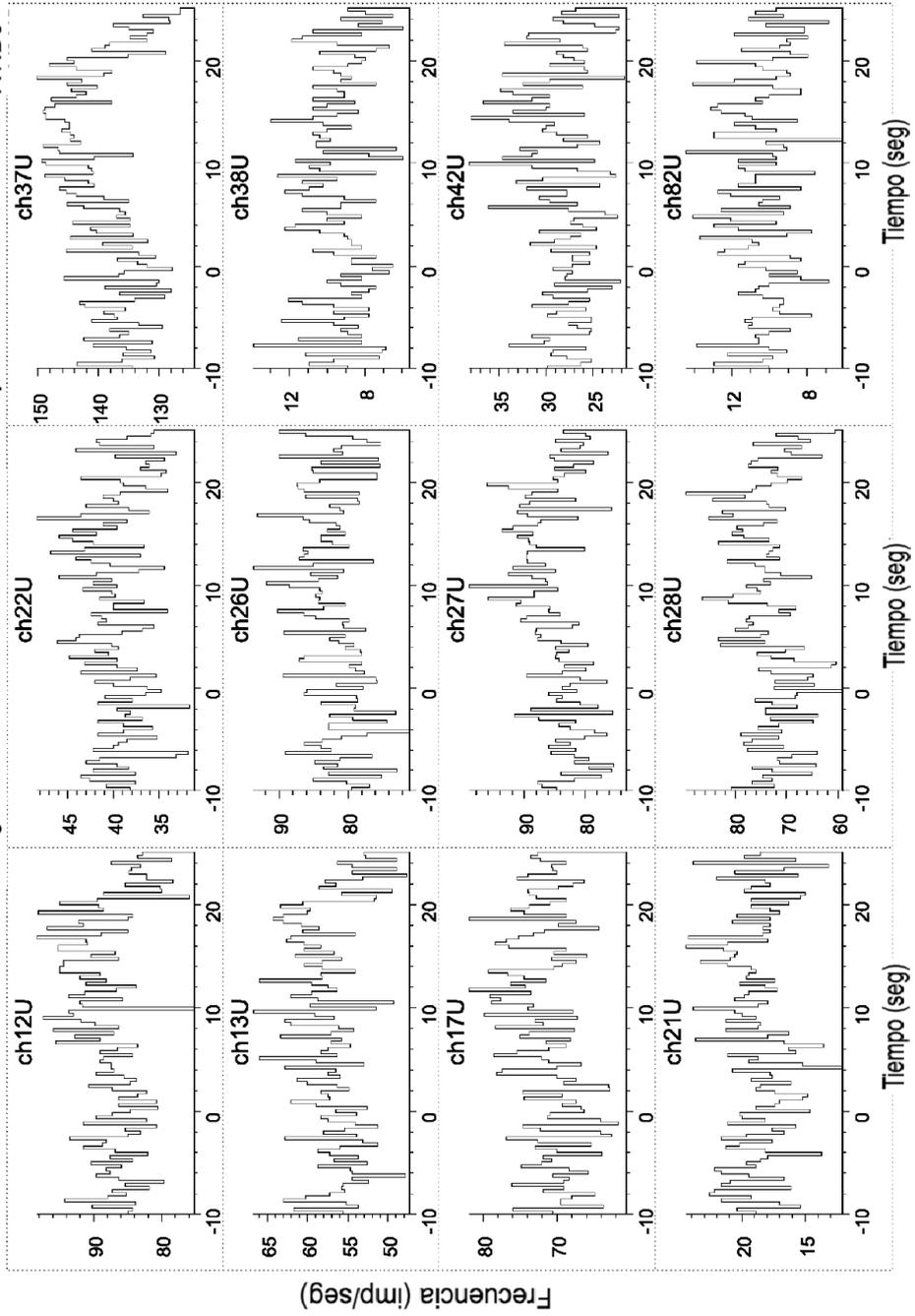


Figura 5

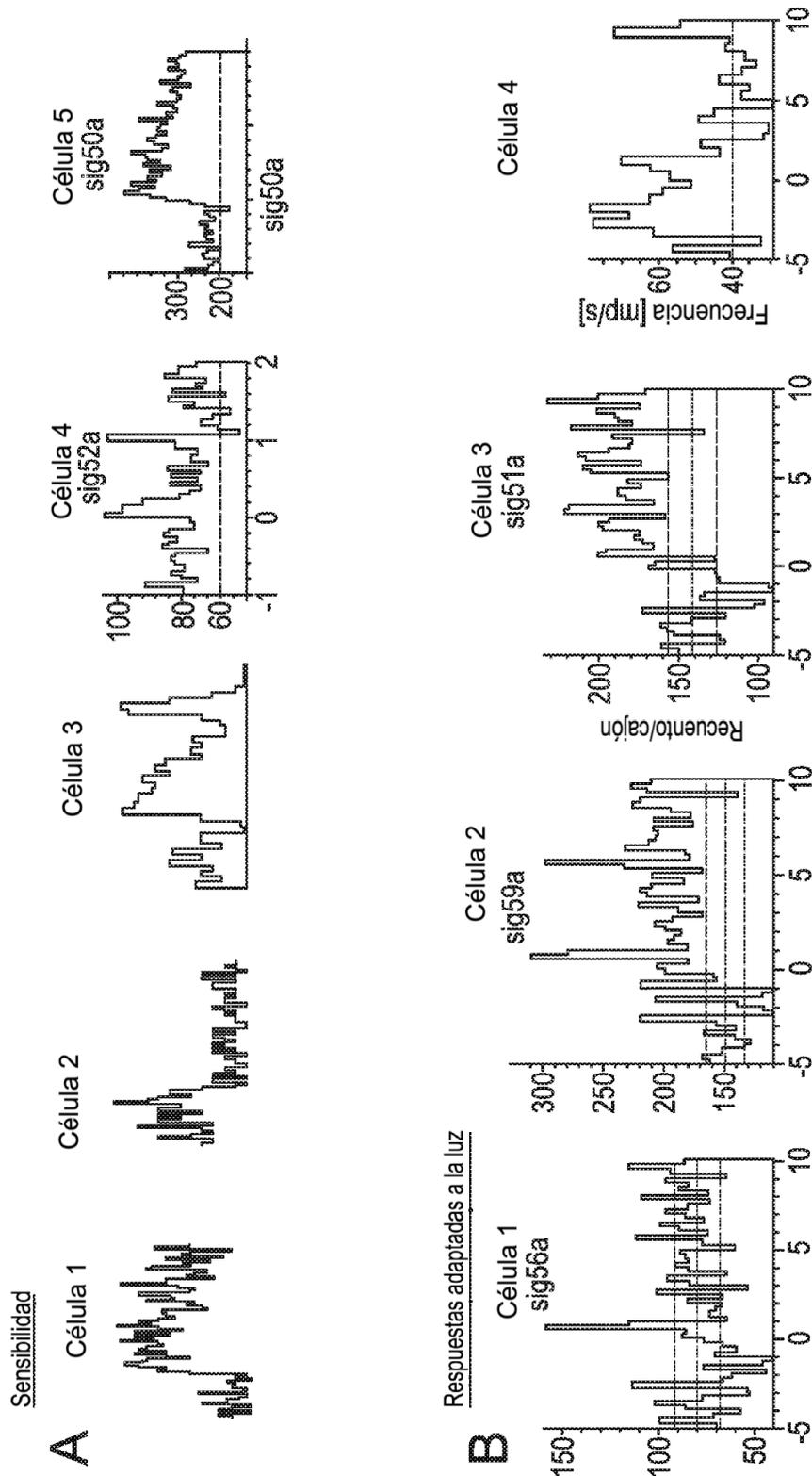
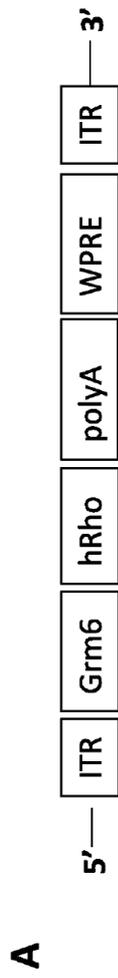
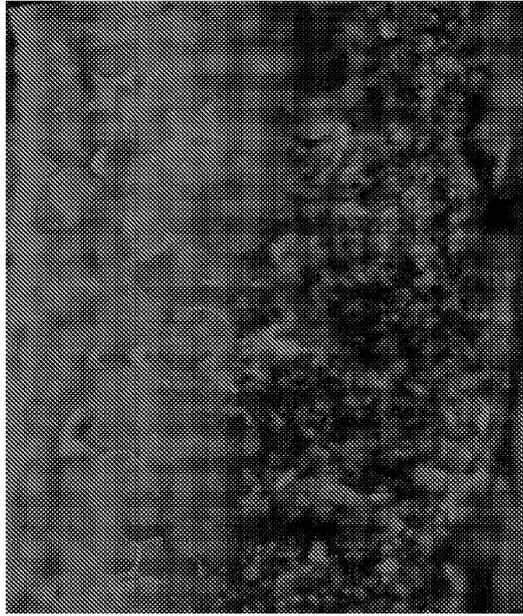


Fig. 6

Figura 7



C



B

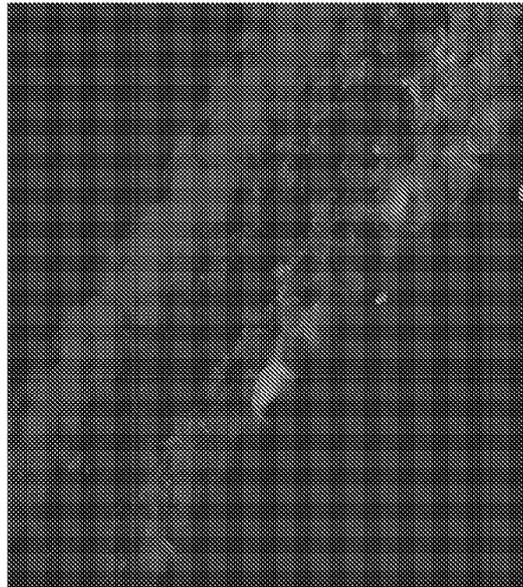


Figura 8

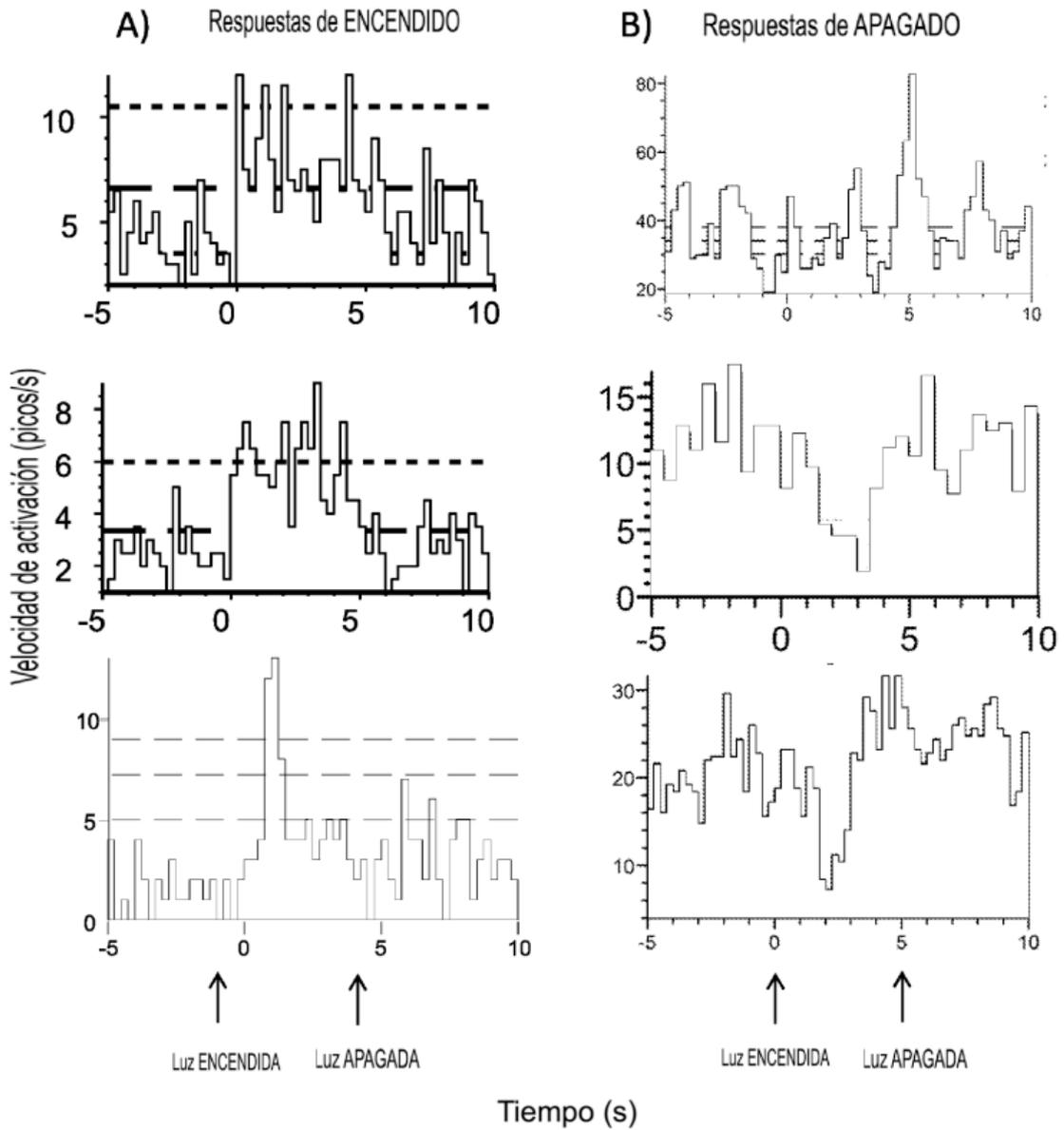


Figura 9

Respuestas a la luz a ND02

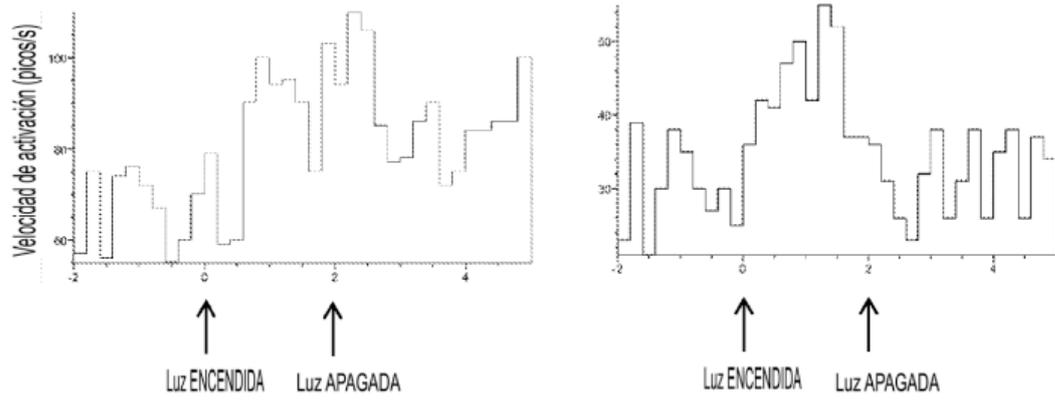
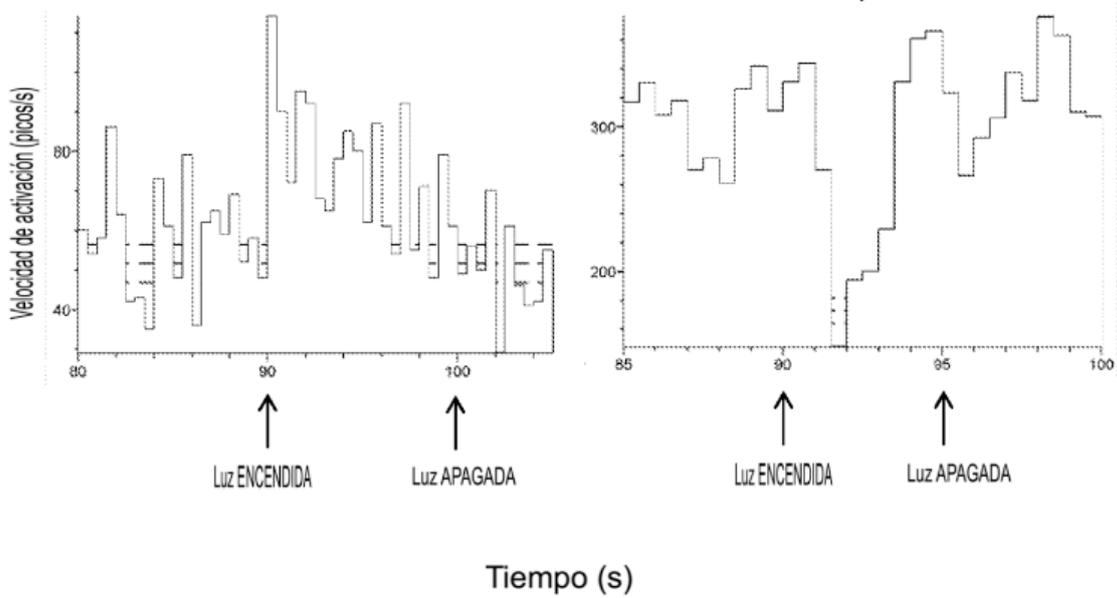


Figura 10



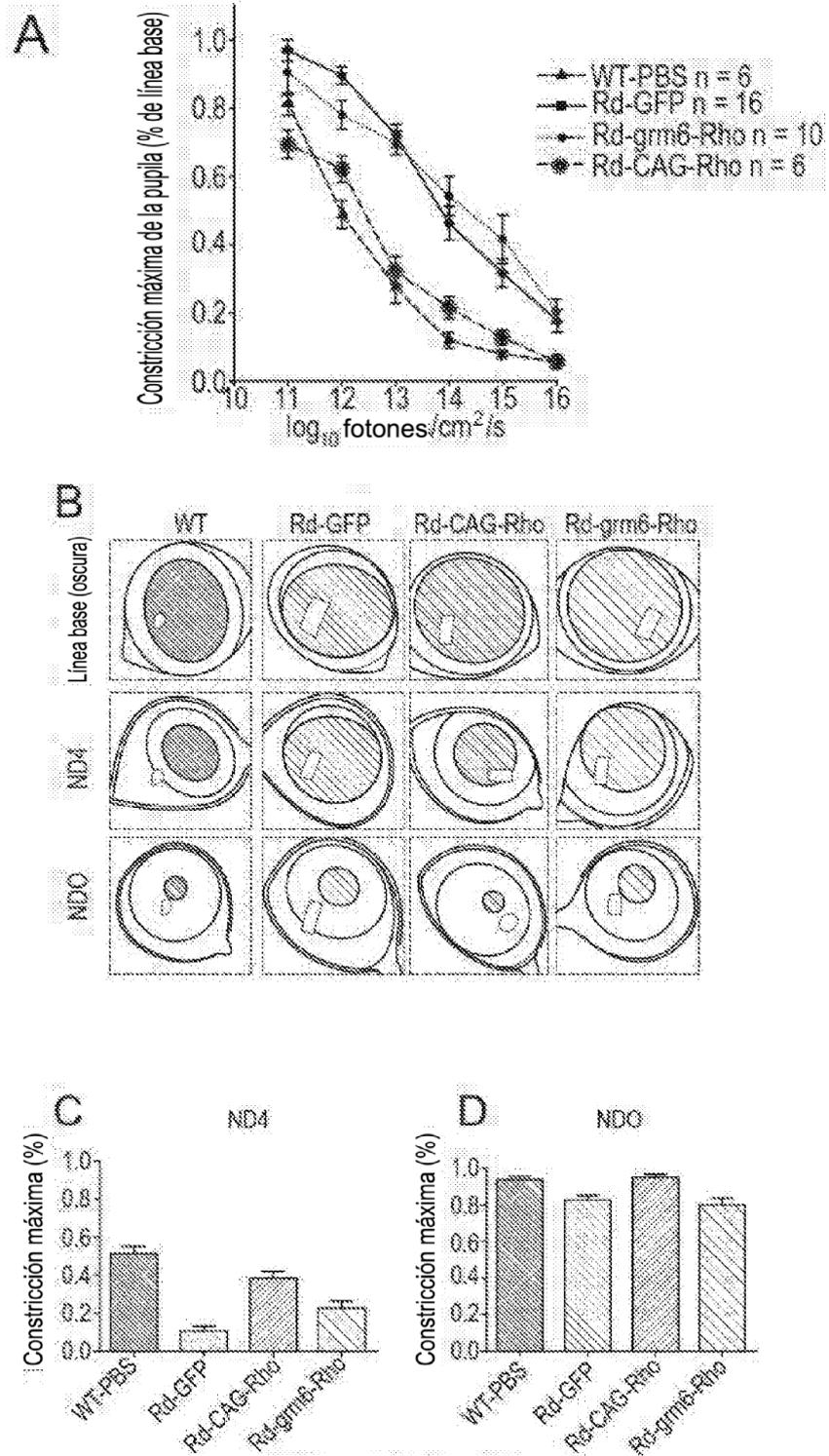


Fig. 11 A - D

Figura 12

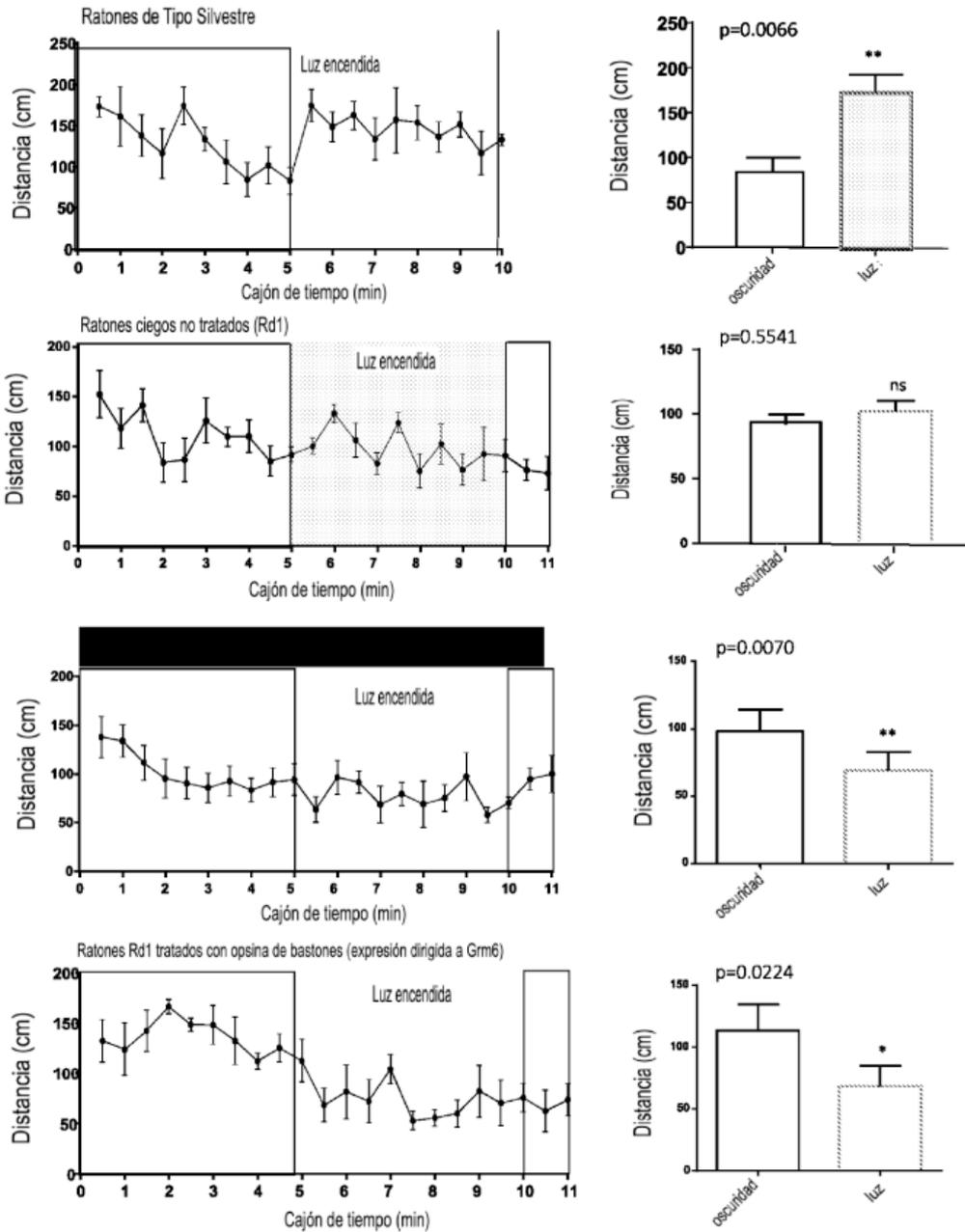


Figura 13

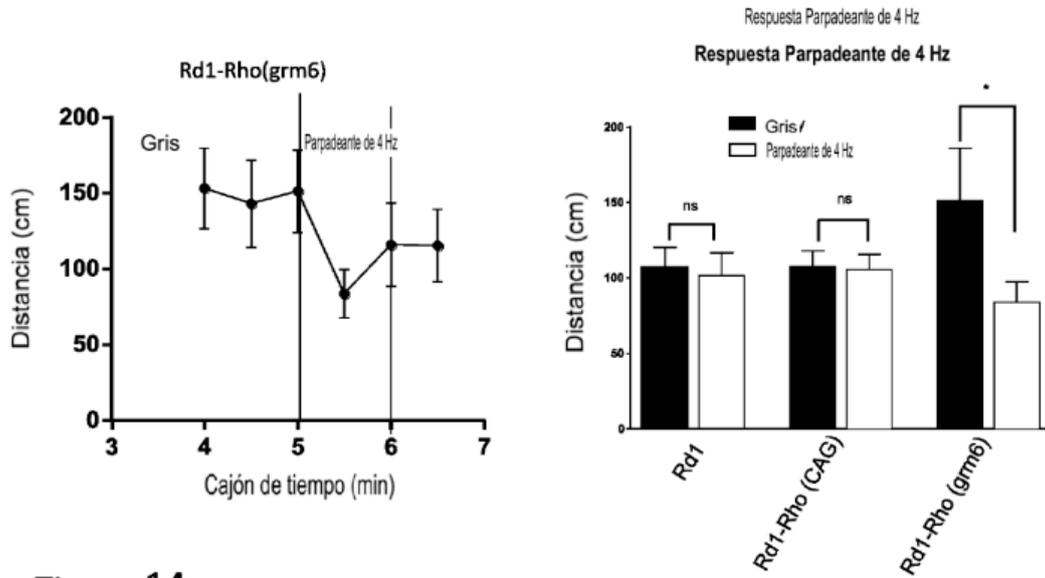


Figura 14

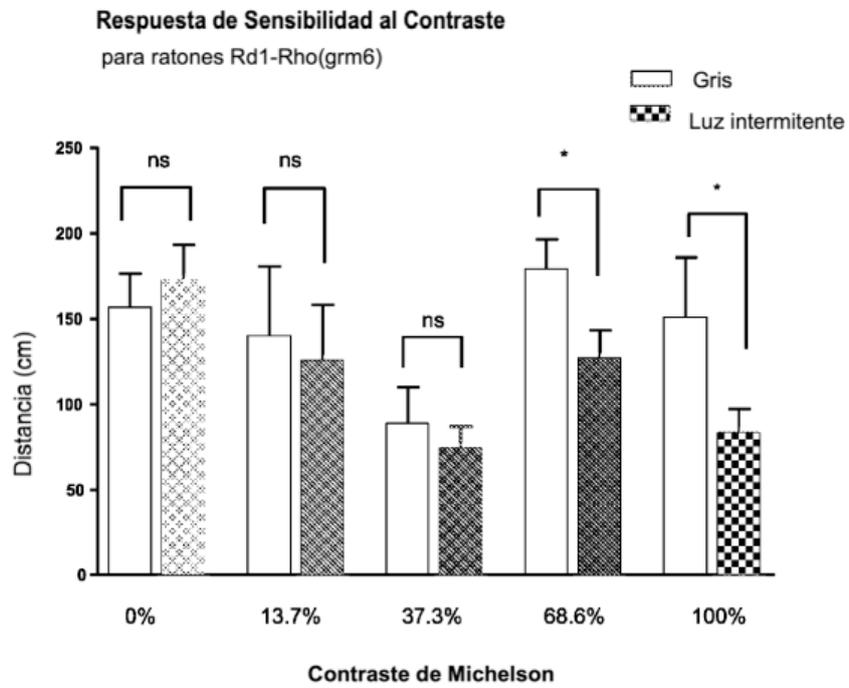
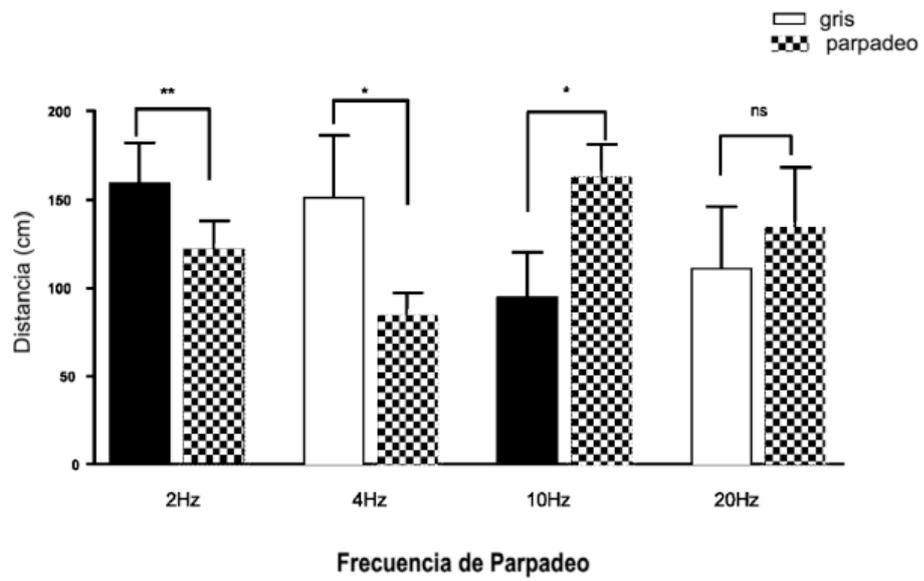


Figura 15 Respuesta a la Frecuencia de Parpadeo
para ratones Rd1-Rho(grm6)



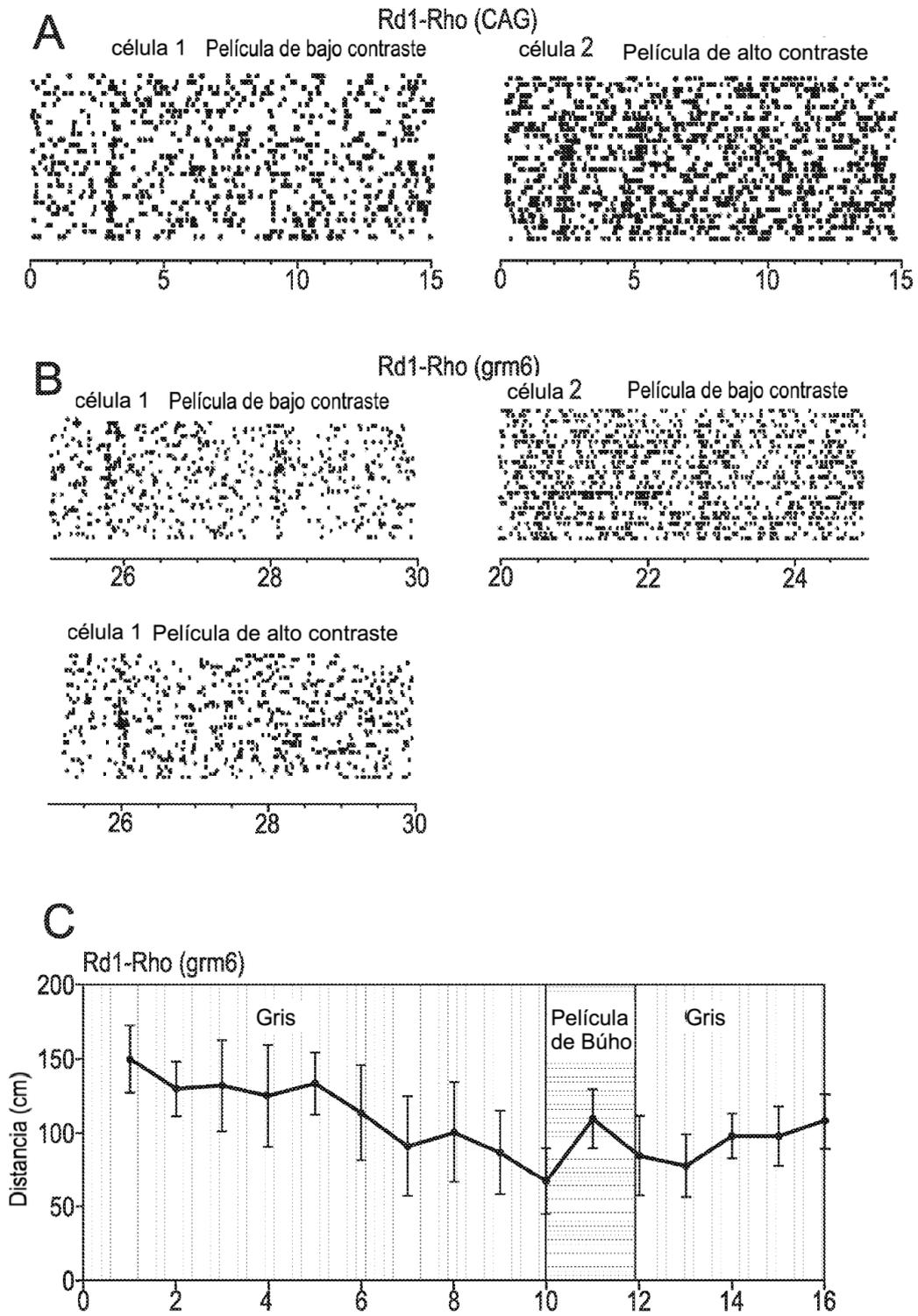


Fig. 16 A -C

Figura 17

