

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 983 990**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/63 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/861 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2018 PCT/US2018/061319**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2019 WO19099696**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2018 E 18878835 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024 EP 3710590**

(54) Título: **Vectores virales que comprenden regiones codificantes de RDH12 y métodos para tratar distrofias de la retina**

(30) Prioridad:

15.11.2017 US 201762586624 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.10.2024

(73) Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN (100.0%)
Office of Technology Transfer, 1600 Huron Parkway, 2nd Floor Ann Arbor, MI 48109-2590, US**

(72) Inventor/es:

THOMPSON, DEBRA A.; ALI, ROBIN R. y SMITH, ALEXANDER J.

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 983 990 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

Vectores virales que comprenden regiones codificantes de RDH12 y métodos para tratar distrofias de la retina

Campo

La invención se refiere a un vector viral adenoasociado para uso en un método para tratar a un sujeto humano que tiene una afección oftalmológica debido a una o más mutaciones de pérdida de la función en el gen que codifica para la proteína Retinol Deshidrogenasa 12 (RDH12), un vector viral adenoasociado, y una célula hospedera aislada que comprende el vector viral adenoasociado proporcionado en la presente.

Antecedentes

La enfermedad de la retina hereditaria (IRD) es una de las principales causas de ceguera legal en niños. La amaurosis congénita de Leber (LCA) y la distrofia de la retina grave de aparición temprana (EOSRD) resultan en discapacidad visual grave empezando en el nacimiento hasta los pocos años de edad, y en conjunto representan el 5% o más de todas las IRD (Koenekoop et al. 2004). LCA/EOSRD se asocia con modos de herencia autosómica dominante y autosómica recesiva, involucrando al epitelio pigmentario de la retina y a los fotorreceptores de bastones y conos como dianas primarias (Weleber et al. 2013). Aproximadamente el 10%

de LCA/EOSRD es causado por mutaciones en el gen que codifica para RDH12 (Kumaran et al. 2017). Dado el papel de RDH12 en el ciclo visual que proporciona cromóforo a las células fotorreceptoras (Haeseleer et al. 2002; Chen et al. 2012), y que constituye una diana terapéutica crítica, RDH12 es uno de los genes LCA más importantes.

A pesar de la prevalencia de afecciones oftalmológicas como la enfermedad de la retina hereditaria en humanos y mamíferos no humanos, y el conocimiento de los genes que codifican para las retinol deshidrogenasas, así como el efecto que tienen algunas mutaciones en esos genes, no se conoce ningún tratamiento para LCA causada por una o más mutaciones en RDH12. Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad en la técnica para materiales y métodos útiles en el tratamiento de distrofias de la retina tales como LCA, así como materiales y métodos útiles para corregir anomalías genéticas que pueden conducir a tales distrofias.

La divulgación se refiere a métodos de tratamiento médico, tales como métodos para tratar a un sujeto humano con una afección oftalmológica, por ejemplo, amaurosis congénita de Leber, debido a al menos una mutación de pérdida de la función en el gen que codifica para la proteína Retinol Deshidrogenasa 12 (RDH12), comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de un ácido nucleico que comprende un vector viral adenoasociado que comprende un ADN complementario (ADNc) de RDH12 de humano.

Thompson et al divultan la expresión mediada por AAV de Rdh12 de humano en la retina de ratón (Thompson et al, ARVO Annual Meeting Abstract, March 2012, URL: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2351889>). WO2016001693 divulga la variante del gen RPGR-ORF 15 en el tratamiento de la retinitis pigmentaria.

WO2011/034947 divulga reactivos y métodos para modular la actividad de los fotorreceptores de cono.

Fingert et al divulan la asociación de una mutación novedosa en el gen de la Retinol Deshidrogenasa 12 (RDH12) con la Retinitis Pigmentaria autosómica dominante (Fingert et al, Ophthalmic Molecular Genetics, 1 September 2008, vol. 126 (NO. 9)).

Sumario

La invención que se reivindica actualmente es tal como se define en las reivindicaciones.

La divulgación proporciona un vector de virus adenoasociado (AAV) que comprende una región codificante para el producto génico del gen RDH12, un gen que codifica para una enzima retinol deshidrogenasa. El vector AAV que comprende RDH12 es útil en el tratamiento de trastornos de distrofia de la retina como Amaurosis Congénita de Leber (LCA) al proporcionar una construcción recombinante en la que una región codificante de RDH12 se coloca bajo el control de un promotor regulable o controlable, tal como un promotor heterólogo, para proporcionar retinol deshidrogenasa complementaria a sujetos que carecen de niveles de actividad de RDH12 del tipo silvestre, como los que resultarían de las mutaciones en RDH12. A pesar de las ventajas de un tamaño de genoma relativamente pequeño, una tendencia relativamente baja a integrarse en el ADN del hospedero y un perfil inmunogénico relativamente bajo, un hallazgo sorprendente ha sido que algunas combinaciones del serotipo de AAV, o pseudotipos, producen niveles de expresión para el producto RDH12 codificado que no es terapéuticamente eficaz y/o que exhibe toxicidad indeseable en el contexto de la administración a sujetos para tratar distrofias de la retina. De acuerdo con ese hallazgo está el hallazgo de que ciertos pseudotipos, como el pseudotipo AAV2/5, demuestran niveles de expresión inesperados y sorprendentemente eficaces y perfiles de toxicidad compatibles con el uso terapéutico para tratar distrofias de la retina. Los sujetos que se pueden tratar mediante métodos divulgados en la presente pueden incluir aquellos que tienen pérdida de la función visual (por ejemplo, respuesta alterada en la prueba de electrorretinograma (ERG), pero que conservan algunas

células fotorreceptoras según lo determinado por tomografía de coherencia óptica (OCT). Por lo tanto, en una instancia, la divulgación proporciona un método para tratar a un sujeto humano que tiene una afección oftalmológica, tal como Amaurosis Congénita de Leber, o LCA, u otra afección oftalmológica clínicamente definida, debido a una o más mutaciones de pérdida de la función en el gen que codifica para la proteína Retinol Deshidrogenasa12 (RDH12). Más particularmente, un aspecto de la invención que se reivindica actualmente proporciona un vector viral adenoasociado como se define en las reivindicaciones para uso en un método para tratar a un sujeto humano que tiene una afección oftalmológica debido a una o más mutaciones de pérdida de la función en el gen que codifica para la proteína Retinol Deshidrogenasa12 (RDH12), comprendiendo el método administrar a al menos un ojo del sujeto el vector viral adenoasociado, en el que el vector viral adenoasociado comprende un ácido nucleico, en el que el ácido nucleico comprende ADN de RDH12 de humano, por ejemplo, ADNc de RDH12 de humano y en el que el ADN de RDH12 de humano codifica para una proteína que es al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 99% idéntica a la longitud completa de SEQ ID NO:2. La afección oftalmológica es Amaurosis Congénita de Leber (LCA).

El ADN de RDH12, por ejemplo, el ADNc de RDH12, está bajo el control de la expresión de un promotor de rodopsina cinasa humana 1 (hGRK1), como en el que el promotor de hGRK1 comprende o consiste esencialmente de SEQ ID NO:3. El vector viral adenoasociado es AAV-2, serotipo 5 (AAV2/5).

En algunas realizaciones, el ADN de RDH12, por ejemplo, el ADNc de RDH12 comprende una secuencia que es al menos 60% o 70% idéntica a SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el ácido nucleico se administra a un título de alrededor de 2×10^{10} genomas virales por mililitro (vg/mL) a alrededor de 2×10^{12} vg/mL, por ejemplo, un título de alrededor de 2×10^{10} genomas virales por mililitro (vg/mL) a alrededor de 2×10^{12} vg/mL, como a alrededor de 2×10^{11} vg/mL o alrededor de 2×10^{12} vg/mL. En algunas realizaciones, el ácido nucleico se administra en el espacio subretinal, por ejemplo, en el que se inserta una cánula de microinyección en el espacio subretinal.

Una instancia de la divulgación se refiere a un ácido nucleico que codifica para un ADN de RDH12 de humano, por ejemplo, un ADNc de RDH12 de humano, en el que el ADN de RDH12 (por ejemplo, ADN de RDH12 de humano tal como ADNc) codifica para una proteína que es al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 99% idéntica a la longitud completa de SEQ ID NO:2, en el que el ADN de RDH12 está bajo el control de un promotor de rodopsina cinasa humana 1 (hGRK1). En algunas realizaciones, el promotor de hGRK1 comprende o consiste esencialmente de SEQ ID NO:3. En algunas realizaciones, el ADN de RDH12 de humano, por ejemplo, el ADNc de RDH12 de humano codifica para una proteína que comprende SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, el ADN de RDH12 de humano, por ejemplo, el ADNc de RDH12 de humano, es al menos 60% o 70% idéntico a la longitud completa de SEQ ID NO: 1.

Otra instancia más de la divulgación es un ácido nucleico como se divulga en la presente para uso en el tratamiento de un sujeto humano que tiene una afección oftalmológica debido a una o más mutaciones de pérdida de la función en el gen que codifica para la proteína Retinol Deshidrogenasa 12 (RDH12). En algunas realizaciones, la afección oftalmológica es Amaurosis Congénita de Leber (LCA).

Otro aspecto de la invención que se reivindica actualmente proporciona un vector viral que comprende un ácido nucleico que codifica para RDH12 como se define en las reivindicaciones. El vector viral es un vector viral adenoasociado. El vector viral adenoasociado es AAV-2, serotipo 5 (AAV2/5).

Otra instancia de la divulgación es un vector viral como se divulga en la presente para uso en el tratamiento de un sujeto humano que tiene una afección oftalmológica debido a una o más mutaciones de pérdida de la función en el gen que codifica para la proteína Retinol Deshidrogenasa 12 (RDH12). En algunas realizaciones, la afección oftalmológica es Amaurosis Congénita de Leber (LCA).

Otro aspecto de la invención que se reivindica actualmente está dirigido a una célula hospedera aislada que comprende un vector viral como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, la célula hospedera aislada expresa una proteína RDH12 de humano.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con habilidades ordinarias en la técnica a la que pertenece esta invención. En la presente se describen métodos y materiales para uso en la presente invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones.

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

Descripción breve de las figuras

La invención que se reivindica actualmente es tal como se define en las reivindicaciones. Cualquiera de las siguientes Figuras que no caiga dentro del alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención que se reivindica actualmente y se proporcionan únicamente con fines comparativos.

Figura 1. Actividad de RDH en el ciclo visual y células fotorreceptoras. (A) El ciclo visual convierte la vitamina A en 11-cis retinal, el cromóforo de los pigmentos visuales, y recicla el todo-trans retinal liberado después del blanqueamiento. (B) Flujo de retinoides mostrado para un par de células fotorreceptoras del RPE. RDH8 en el segmento externo puede reducir a todo-trans retinal. RDH12 en el segmento interno puede reducir a todo-trans retinal, 11-cis retinal y otros aldehídos de cadena corta tóxicos. Abreviaciones: 11cRAL, 11-cis retinal; 11cROL, 11-cis retinol; AtRAL, todo-trans retinal; AtROL, todo-trans retinol; RCHO, aldehído de cadena corta; RCHOH, alcohol de cadena corta; Rh, rodopsina; MRh: metarrodopsina.

Figura 2. Expresión y localización de RDH12 recombinante en ratones inyectados con AAV2/5-hGRK1p.hRDH12. (A) Esquema de la construcción de terapia génica AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 en la que un ADNc de RDH12 de humano se clona corriente abajo de un promotor de rodopsina cinasa humana, entre secuencias repetidas terminales invertidas derivadas del genoma de AAV2. (B, C) Expresión de la proteína RDH12 de humano en retinas de ratón 6 semanas después de la inyección subretinal de AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 (1.3×10^9 vg) o de PBS, evaluada utilizando anticuerpos específicos para Rdh12 de ratón o RDH12 de humano. (B) Análisis de inmunodetección de lisados de la retina de ratones C57BL/6J, ratones *Rdh12^{-/-}* inyectados con PBS y ratones *Rdh12^{-/-}* inyectados con AAV2/5-hGRK1p.hRDH12. (C) El análisis inmunohistoquímico muestra la localización de Rdh12 nativa de ratón (gris oscuro) en IS, ONL y OPL de la retina en ratones C57BL/6J, pero no en ratones *Rdh12^{-/-}*, mientras que RDH12 de humano recombinante (gris claro) resultante de la inyección de AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 muestra una localización similar tanto en ratones C57BL/6J como en *Rdh12^{-/-}*. Imágenes de contraste de fase (izquierda). Abreviaciones: ITR, repetición terminal invertida; hGRK1, promotor de rodopsina cinasa humana; SD/SA, sitio donante de empalme/aceptor de empalme del virus de simio 40; hRDH12, ADNc de RDH12 de humano; poliA, señal de poliadénilación del virus de simio 40; RPE, epitelio pigmentario de la retina; OS, segmentos externos; IS, segmentos internos; ONL, capa nuclear externa; OPL, capa plexiforme externa; INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa de células ganglionares.

Figura 3. La terapia de reemplazo génico AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 restaura la función de RDH12 en ratones deficientes de *Rdh12^{-/-}*. (A) Análisis mediante HPLC de la actividad de la retinal reductasa en retinas de ratones C57BL/6J y *Rdh12^{-/-}* inyectados con AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 (1.3×10^9 vg) o con PBS, o no inyectados. A las 6 semanas después de la inyección, la formación de todo-trans retinol se cuantificó en ensayos con todo-trans retinal como sustrato. Cada punto de datos representa la media ± error estándar para un mínimo de 5 experimentos independientes donde se agruparon y analizaron retinas de 3 a 5 ratones por triplicado • C57BL/6J; △ *Rdh12^{-/-}*; ◇ *Rdh12^{-/-}* inyectado con PBS; ■ *Rdh12^{-/-}* inyectado con AAV. (B) Inmunohistoquímica de la expresión de RDH12 recombinante en una sección de retina completa de ratón *Rdh12^{-/-}* evaluada 16 semanas después de la inyección de AAV2/5-hGRK1p.hRDH12. La RDH12 de humano (gris claro) se localiza en IS, ONL y OPL de la región inyectada de la retina (lado derecho de la imagen).

Figura 4. La terapia de reemplazo génico AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 reduce el daño causado por la luz en ratones deficientes de *Rdh12* albinos. Se realizó un análisis de ERG, una semana antes y una semana después de la exposición a 5,000 lux durante 2 horas, en ratones a los que se les inyectó en un ojo con AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 y no fueron inyectados en el ojo contralateral. Se cuantificaron las respuestas escotópicas (bastones aislados y conos y bastones combinados) para grupos de 10-13 ratones, y se calculó el porcentaje de la respuesta al ERG inicial restante después del daño causado por la luz. Se muestran los resultados promediados con errores estándar, así como la significancia de las diferencias entre ojos inyectados y no inyectados calculadas utilizando análisis de prueba t pareada de dos colas.

Figura 5. AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 no afecta significativamente los niveles en estado estacionario de 11-cis retinal en la retina. Los ratones recibieron AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 (1.3×10^9 vg) o PBS mediante inyección subretinal, o no fueron inyectados. Después de la adaptación a la oscuridad durante la noche, los retinoides se extrajeron bajo luz roja tenue y se cuantificaron mediante análisis por HPLC. (A) Cromatogramas representativos para cada condición de tratamiento; están indicados picos para oxima de sin-11-cis retinal, oxima de anti-11-cis retinal y oxima de sin-todo-trans retinal. Niveles retinales totales de (B) 11-cis retinal y (C) todo-trans retinal para cada condición de tratamiento ± error estándar (■ C57BL/6J no inyectado; ■■■ *Rdh12^{-/-}* no inyectado; ■■ *Rdh12^{-/-}* inyectado con AAV; □ *Rdh12^{-/-}* inyectado con PBS).

Figura 6. La función de la retina no se ve afectada negativamente por AAV2/5-hGRK1p.hRDH12. Las respuestas escotópicas (bastones aislados y conos y bastones combinados) y fotópicas (mediadas por conos) al electrorretinograma (ERG) registradas 6 semanas después del tratamiento de ratones C57BL/6J, no inyectados; *Rdh12^{-/-}*, no inyectados; y *Rdh12^{-/-}* inyectados con AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 (hasta 2×10^9 vg). Se muestran los ERG de un animal representativo en cada grupo de tratamiento medidos 6 semanas después de la inyección.

Figura 7. La localización de los pigmentos visuales no se ve perturbada por AAV2/5-hGRK1p.hRDH12. Localización inmunohistoquímica de rodopsina y opsina de cono en ratones *Rdh12^{-/-}* inyectados y no inyectados (1.3×10^9 vg) evaluados 16 semanas después del tratamiento. La expresión de la proteína RDH12 de humano

en IS y ONL (gris claro). Rodopsina y opsina roja/verde (gris oscuro) en ojos inyectados con AAV2/5-*hGRK1p.RDH12*. Las abreviaciones son como se describen en la Figura 2.

Figura 8. La estructura de la retina no se daña por la expresión a largo plazo de AAV2/5-*hGRK1p.RDH12*. Análisis de tomografía de coherencia óptica (OCT) de ojos de ratones C57BL/6J y *Rdh12^{-/-}* evaluados 54 semanas después de la inyección de AAV2/5-*hGRK1p.RDH12* (hasta 2×10^9 vg).

Figura 9. Infiltración de macrófagos CD68+ y expresión de RDH12 en retinas inyectadas con AAV2/8-*hGRK1p.RDH12*. Los ratones *Rdh12^{-/-}* y C57BL/6J evaluados mediante análisis inmunohistoquímico 8 semanas después de la inyección subretinal de AAV2/8-*hGRK1p.RDH12* (2×10^9 vg). Expresión de RDH12 de humano en IS, ONL y OPL (gris claro) y etiquetado de macrófagos con CD68 (blanco). Las abreviaciones son como se describen en la Figura 2.

Descripción detallada

La invención que se reivindica actualmente es tal como se define en las reivindicaciones. Los métodos de tratamiento como tales no forman parte de la invención reivindicada, pero se discuten en la presente como tema relacionado.

La degeneración hereditaria de la retina es una causa rara de pérdida profunda de la visión que es un enfoque de los esfuerzos actuales para desarrollar terapia génica dirigida. La terapia génica somática mediada por vectores virales se ha mostrado muy prometedora en el tratamiento de modelos animales de enfermedad degenerativa de la retina humana. Hasta la fecha, se han realizado diversos estudios exitosos que utilizan la administración de genes mediada por virus adenoasociados (AAV) para rescatar la degeneración de fotorreceptores en modelos de animales pequeños (Ali et al. 2000; Pang et al. 2012; Pawlyk et al. 2010; Pawlyk et al. 2005; Tan et al. 2009) y modelos de animales grandes (Acland et al. 2001; Alexander et al. 2007; Beltran et al. 2012; Komaromy et al. 2010; Lheriteau et al. 2009). En estos casos, el epitelio pigmentario de la retina (RPE) o los fotorreceptores han sido las dianas primarias para la expresión transgénica. Además, los ensayos clínicos de fase I que involucran terapia génica para pacientes con Amaurosis Congénita de Leber (LCA) dirigida al RPE (Bainbridge et al. 2008; Cideciyan et al. 2008; Maguire et al. 2008) y más recientemente a coroideremia (MacLaren et al. 2014), ya han tenido cierto éxito. Actualmente no existen ensayos clínicos que utilicen la terapia de reemplazo génico mediada por AAV para el tratamiento de pacientes con degeneración de la retina hereditaria causada por mutaciones en *RDH12*.

Con un interés en desarrollar terapia génica mediada por AAV para el tratamiento de individuos con mutaciones en *RDH12*, generamos vectores de virus adenoasociados que transportan ADNc de *RDH12* de humano en los que la expresión está bajo el control de un promotor de rodopsina cinasa. En el estudio divulgado de vectores con cápsides derivadas de AAV del serotipo 5 o de AAV del serotipo 8, hemos demostrado que la administración subretinal de AAV2/5-*hGRK1p.RDH12* en ratones deficientes de *Rdh12* (*Rdh12^{-/-}*) da como resultado la expresión de RDH12 de humano recombinante que es estable, se localiza correctamente, reconstituye la actividad de la retinal reductasa, reduce la susceptibilidad al daño causado por la luz y no causa la toxicidad retinal observada con AAV2/8-*hGRK1p.RDH12*. Esta construcción AAV2/5-*hGRK1p.RDH12* proporciona un producto para terapia de reemplazo génico de *RDH12*.

RDH12

Las mutaciones en el gen que codifica para retinol deshidrogenasa 12 (RDH12) causan una degeneración de la retina grave de aparición temprana, diagnosticada con mayor frecuencia como amaurosis congénita de Leber (LCA) o distrofia de la retina grave de aparición temprana (EOSRD). Miembro de la familia de deshidrogenasas/reductasas de cadena corta, RDH12 es esencial para reducir retinaldehídos que se generan por la actividad de la vitamina A del ciclo visual, que es integral para la respuesta a la luz de las células fotorreceptoras. Cuando los pigmentos visuales que contienen el cromóforo 11-cis retinal absorben un fotón de luz, 11-cis retinal se isomeriza a todo-trans retinal, iniciando así una cascada de transducción de señales que regula la señalización sináptica. La inactivación de los pigmentos visuales implica la liberación de todo-trans retinal, su reducción a todo-trans retinol y su regreso al epitelio pigmentario de la retina (RPE) para la regeneración del cromóforo 11-cis retinal (Figura 1A). Cuando estas reacciones de reciclaje son inefficientes o se interrumpen, por ejemplo, por envejecimiento o enfermedad hereditaria, los retinaldehídos y los productos de la condensación de retinaldehído se acumulan en los fotorreceptores y el epitelio pigmentario de la retina, lo que resulta en un daño profundo a la retina externa (Ben-Shabat et al. 2001; Thompson et al. 2003; Sparrow, 2010; Chen et al. 2012).

Para proteger contra la toxicidad, en la retina se expresan diversas proteínas y enzimas de unión a retinoides. RDH12 es un miembro de la familia de deshidrogenasas/reductasas de cadena corta que utilizan NADPH para reducir una amplia gama de sustratos, incluyendo cis- y trans-retinaldehídos (Haeseleer et al. 2002), aldehídos C9 generados como resultado de la fotooxidación de lípidos (Belyaeva et al. 2005; Lee et al. 2008; Marchette et al. 2010) y sustratos esteroides (Keller et al. 2007). Individuos con mutaciones de pérdida de la función en el gen de *RDH12* exhiben un fenotipo de degeneración de la retina grave, a menudo diagnosticado como

amaurosis congénita de Leber (LCA) (Janecke et al. 2004; Thompson et al. 2005; Perrault et al. 2004; den Hollander et al. 2008; Mackay et al. 2011), para la cual actualmente no existen tratamientos ni curas. RDH12 se localiza en los segmentos internos de las células fotorreceptoras de conos y bastones (Haeseler et al. 2002; Maeda et al. 2006) donde protege contra el daño inducido por la luz causado, al menos en parte, por retinaldehídos reactivos (Maeda et al. 2006). Se ha demostrado que el todo-*trans* retinal generado después de la exposición a la luz se filtra de los segmentos externos de los fotorreceptores a los segmentos internos, y su eliminación efectiva de las células fotorreceptoras requiere la actividad de tanto RDH8 presente en los segmentos externos como de RDH12 presente en los segmentos internos (Chen et al. 2012) (Figura 1B). Como tal, RDH12 también tiene el potencial de jugar un papel importante en la reducción del 11-*cis* retinal presente en exceso de lo requerido para la biosíntesis de opsina, que puede ingresar al segmento interno desde el espacio subretinal (Chen et al. 2012).

Para investigar el potencial de la terapia de reemplazo génico para LCA/EOSRD debido a mutaciones en *RDH12*, generamos vectores de virus adenoasociados que portan un ADNc de *RDH12* de humano, en el que la expresión está bajo el control de un promotor de rodopsina cinasa que dirige la expresión específica de las células fotorreceptoras (Khani et al. 2007; Sun et al. 2010; Young, et al. 2003). La construcción de ADN se empaquetó con una cápside derivada de AAV del serotipo 8 que media la transducción eficiente y robusta de células fotorreceptoras (Allocca et al. 2007; Natkunarajah et al. 2008; Vandenberghe et al. 2011; Vandenberghe et al. 2013), o con una cápside de AAV del serotipo 5 que media la transducción de fotorreceptores, pero con cinéticas más lentas y una expresión menos robusta en comparación con la cápside de AAV del serotipo 8 (Yang et al. 2002; Lotery et al. 2003; Allocca et al. 2007; Lebherz et al. 2008).

En estudios comparativos realizados en un modelo de ratón con deficiencia de *Rdh12* (*Rdh12*^{-/-}) (Kurth et al. 2007), nuestro trabajo ha demostrado que los dos vectores tienen perfiles de seguridad significativamente diferentes, con *AAV2/5-hGRK1p.hRDH12* demostrando niveles de expresión inesperados y sorprendentemente eficaces y perfiles de toxicidad compatibles con el uso terapéutico para tratar distrofias retinales.

25 Secuencia de RDH12 de humano

La secuencia de un ADNc de RDH12 de humano ejemplar, que consta de los nucleótidos -10 a +980 relativos al sitio de inicio de la traducción, que codifica para los siete exones de RDH12 traducidos (GenBank # NM_152443) se proporciona en SEQ ID NO:1.

La secuencia de la proteína de RDH12 de humano de longitud completa se proporciona en SEQ ID NO:2.

30 Promotor de rodopsina cinasa (hGRK1p)

En algunas realizaciones de los métodos descritos en la presente, se utiliza una construcción génica de reemplazo en la que un ADNc de RDH12 de humano como se describe en la presente se coloca bajo el control de un promotor de rodopsina cinasa humana (hGRK1). En algunas realizaciones, el promotor de hGRK1 tiene aproximadamente 200 pares de bases (pb) de longitud contenido un promotor corto derivado del gen hGRK1 de la rodopsina cinasa (RK), el cual se ha demostrado que dirige la expresión específica de células en bastones y conos (Khani et al. 2007; Sun et al. 2010; Young, et al. 2003). Una secuencia promotora de hGRK1 ejemplar contiene los nucleótidos -112 a +87 de SEQ ID NO:3 (Khani et al. 2007).

Vector viral de administración

El ADNc de *RDH12* de humano abreviado, como se describió anteriormente, se empaqueta en un vector de administración, es decir, un vector AAV2/5.

Los genes de reemplazo (ADNc) se pueden administrar en cualquier portador eficaz, por ejemplo, cualquier formulación o composición capaz de administrar eficazmente el gen componente a las células *in vivo*. Las aproximaciones incluyen la inserción del gen en vectores virales no patógenos, no replicantes, incluyendo retrovirus recombinantes, adenovirus, virus adenoasociados, lentivirus y virus del herpes simplex-1, o plásmidos bacterianos o eucarióticos recombinantes. Los vectores virales transfecan células directamente; El ADN de plásmido se puede administrar desnudo o con la ayuda de, por ejemplo, liposomas catiónicos (lipofectamina) o derivatizado (por ejemplo, conjugado con anticuerpo), conjugados de polilisina, gramicidina S, envolturas virales artificiales u otros portadores intracelulares similares, así como inyección directa de la construcción génica o precipitación de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ realizada *in vivo*.

50 Una aproximación preferible para la introducción *in vivo* de ácido nucleico a una célula se realiza mediante el uso de un vector viral que contiene ácido nucleico, por ejemplo, un ADNc. La infección de células con un vector viral tiene la ventaja de que una gran proporción de las células diana pueden recibir el ácido nucleico. Además, las moléculas codificadas dentro del vector viral, por ejemplo, mediante un ADNc contenido en el vector viral, se expresan eficazmente en células que han absorbido el ácido nucleico del vector viral. Se pueden utilizar vectores de retrovirus y vectores derivados de adenovirus como un sistema de administración génica recombinante para la transferencia de genes exógenos *in vivo*, particularmente en humanos, en diversos tipos

de células. Sin embargo, no transducen las células fotorreceptoras con suficiente eficacia como para que sean útiles para esta aplicación.

Otro sistema más de vector viral útil para la administración de ácidos nucleicos es el virus adenoasociado (AAV). El virus adenoasociado es un virus defectuoso de origen natural que requiere de otro virus, como un adenovirus o un virus del herpes, como virus auxiliar para una replicación eficiente y un ciclo de vida productivo (Muzyczka et al. 1992). También es uno de los pocos virus que puede integrar su ADN en células que no se dividen y exhibe una alta frecuencia de integración estable (véase, por ejemplo, Flotte et al. 1992; Samulski et al. 1989; y McLaughlin et al. 1988). Los vectores que contienen tan solo 300 pares de bases de AAV se pueden empaquetar e integrar. El espacio para el ADN exógeno está limitado a alrededor de 4.5 kb. Se puede utilizar un vector AAV como el descrito en Tratschin et al., 1985 para introducir ADN en las células. Se han introducido diversos ácidos nucleicos en diferentes tipos de células utilizando vectores AAV (véase, por ejemplo, Hermonat et al. 1984; Tratschin et al. 1984a; Tratschin et al. 1984b; Wondisford et al. 1988; y Flotte et al. 1993).

El vector viral de administración es un virus AAV2/5 recombinante. Antes de la administración, el producto final puede someterse a una serie de pasos de ultrapurificación para cumplir con los criterios de grado clínico.

15 Selección del sujeto

Los sujetos que son candidatos para los tratamientos reivindicados incluyen aquellos que tienen un diagnóstico de LCA causado por mutaciones en el gen que codifica para RDH12. Sujetos que padecen otras afecciones oftalmológicas clínicamente definidas causadas por mutaciones en el gen que codifica para RDH12, por ejemplo, retinitis pigmentaria de aparición temprana, también se pueden tratar utilizando los métodos descritos en la presente. Se puede realizar un diagnóstico de LCA u otra afección oftalmológica causada por mutaciones en el gen que codifica para RDH12 utilizando métodos conocidos en la técnica.

Los métodos descritos en la presente pueden incluir identificar a un sujeto, por ejemplo, un niño, adolescente o adulto joven que tiene LCA u otra afección oftalmológica causada por una o más mutaciones en el gen que codifica para RDH12, o que se sospecha que tiene LCA u otra afección oftalmológica causada por una o más mutaciones en el gen que codifica para RDH12 (por ejemplo, basándose en la presencia de síntomas de la afección y ninguna otra causa obvia), y obteniendo una muestra que comprende ADN genómico del sujeto, detectando la presencia de mutaciones en *RDH12* utilizando métodos de biología molecular conocidos, y seleccionando un paciente que tiene mutaciones en ambos alelos de *RDH12* que causan LCA u otra afección. Los síntomas de la afección incluyen atrofia macular, adelgazamiento de la fóvea y alteración de la arquitectura laminar, lo que resulta en pérdida temprana de la visión central y progresión a visión LP. Los campos visuales están restringidos a la edad más temprana medida y las respuestas al ERG ya no se pueden registrar en la edad adulta temprana. Detectar mutaciones en *RDH12* puede incluir secuenciar todo o parte del gen de *RDH12* en un sujeto, y comparar la secuencia con una secuencia de referencia (por ejemplo, No. de acceso a GenBank NG_008321.1) para detectar una mutación. Mutaciones de cambio de marco, mutaciones de truncamiento, mutaciones que alteran un aminoácido conservado, mutaciones que afectan el empalme de la transcripción, o mutaciones que afectan una región reguladora (por ejemplo, promotor) se consideran mutaciones que pueden causar LCA u otra afección oftalmológica como se describe en la presente; una alteración en la función se puede confirmar expresando a la mutante *in vitro* (por ejemplo, en células cultivadas), y probando, por ejemplo, función enzimática. Las mutaciones ejemplares en el estado homocigoto incluyen: Glu127X, Gln189X, Tyr226Cys, Ala269GlyfsX1 y Leu274Pro (todas las referencias a la posición se refieren a la secuencia de la proteína RDH12 de SEQ ID NO:2). Las mutaciones ejemplares en el estado heterocigoto compuesto incluyen: Thr49Met/Arg62X; Arg65X/Ala269GlyfsX1; His151D/Thr155Ile; His151D/Arg269GlyfsX1 (Janecke et al. 2004; Schuster et al. 2007). (Las posiciones se refieren a la secuencia de la proteína de SEQ ID NO:2).

45 Pacientes con LCA u otra afección oftalmológica debido a al menos una mutación en *RDH12* que se pueden tratar utilizando un método descrito en la presente preferiblemente conservan algunos fotorreceptores y función visual, por ejemplo, medida mediante pruebas de campo o función visual estándar y/o Tomografía de Coherencia Óptica (OCT, por ejemplo, Dominio espectral-OCT (SD-OCT)). Los métodos descritos en la presente pueden incluir identificar sujetos que han sido diagnosticados con LCA u otra afección oftalmológica debido a al menos una mutación en *RDH12*, que tienen al menos una mutación confirmada en *RDH12* que causa su afección, y probando su capacidad visual y detectando la presencia de fotorreceptores centrales residuales.

Ejemplos

Como se describe en otra parte de la presente, la invención que se reivindica actualmente es tal como se define en las reivindicaciones. Cualquiera de los siguientes Ejemplos que no caiga dentro del alcance de las reivindicaciones no forma parte de la invención que se reivindica actualmente y se proporcionan únicamente con fines comparativos.

55 El tema divulgado y reivindicado se describe con más detalle en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Materiales y métodos

Los siguientes materiales y métodos se utilizaron en los experimentos divulgados en los Ejemplos expuestos a continuación.

Animales

5 La generación y el análisis de ratones *Rdh12^{-/-}* han sido descritos previamente (Kurth et al. 2007). Los ratones *Rdh12^{-/-}* utilizados en este estudio fueron criados a partir de apareamientos entre hermanos entre machos y hembras nulicigotos mantenidos en nuestra instalación institucional para animales. Los ratones WT que se utilizaron en el estudio fueron C57BL/6 de The Jackson Laboratory (Wilmington, MA).

10 Para los estudios divulgados en la presente se utilizaron ratones transgénicos de los siguientes genotipos: ratones *Rdh12^{-/-}* en fondo C57BL/6J homocigotos para la variante Rpe65-Met450 (M/M) (Kurth, 2007), y ratones albinos *Rdh12^{-/-}* con fondo BALB/c homocigotos para la variante Rpe65-Leu450 (L/L) (Chrispell, 2009), que se obtuvieron mediante reproducción. Los ratones se criaron en un ciclo de 12 horas (luz)/12 horas (oscuridad) y fueron sacrificados por inhalación de CO₂ después del neumotórax bilateral.

Construcción del plásmido y producción de AAV2/5 y VAA2/8 recombinantes

15 El ADNc de RDH12 de humano se amplificó a partir de ADNc de retina de humano mediante PCR utilizando cebadores diseñados para abarcar toda la región codificante de RDH12, se clonó y se secuenció para verificar la fidelidad, como se describió anteriormente (Janecke et al. 2004). Para construir los vectores AAV, se insertó ADNc de *RDH12* en el sitio de clonación múltiple del vector parental *pAAV-hGRK1-hrGFP*. El vector *pAAV-hGRK1-Rdh12* resultante se empaquetó en AAV. Los vectores pseudotipados AAV2/5 y AAV2/8 se generaron mediante transfección bipartita: (1) plásmido del vector de AAV que codifica para el gen de interés, (2) plásmido auxiliar de AAV que codifica para las proteínas Rep de AAV del serotipo 2 y las proteínas Cap del ya sea serotipo 5 o serotipo 8, y funciones auxiliares del adenovirus en células 293T. La transfección y purificación se realizaron utilizando un protocolo publicado (Nishiguchi et al 2015). Dos días después de la transfección, las células se lisaron mediante ciclos repetidos de congelación y descongelación. Después de la limpieza inicial de los restos celulares, el componente de ácido nucleico de las células productoras de virus se eliminó mediante el tratamiento con Benzonasa. Las partículas del vector AAV recombinante se purificaron mediante cromatografía de afinidad utilizando una matriz de AVB, se lavaron en PBS 1x y se concentraron a un volumen de 100-150 ml utilizando concentradores Vivaspin 4 (10 kDa). Los vectores se titularon mediante amplificación por qPCR.

Inyecciones subretinales

30 Se colocaron cohortes de ratones de aproximadamente 4 semanas de edad bajo anestesia general con una inyección intraperitoneal de ketamina (90 mg/kg)/xilazina (9 mg/kg). Se aplicó una solución de proparacaina al 0.5% en la córnea como anestésico tópico. Las pupilas se dilataron con aplicación tópica de tropicamida (0.5%). Bajo un microscopio quirúrgico oftálmico, se realizó una pequeña incisión a través de la córnea adyacente al limbo utilizando una aguja de calibre 30. Se insertó una aguja roma de calibre 34 colocada en una jeringa Hamilton a través de la incisión detrás del cristalino y se empujó a través de la retina. Todas las inyecciones se realizaron por vía subretinal en una ubicación dentro del cuadrante nasal de la retina. Cada ojo recibió hasta 2 × 10⁹ vg de AAV2/5-(*hGRK1*)-*hRDH12* en un volumen de hasta 2 µL. El vector que codifica para RDH12 se administró por separado a un ojo de cada ratón que recibió tratamiento, y los ojos contralaterales no se inyectaron. El examen de fondo del ojo después de la inyección encontró que más del 30% de la retina se había desprendido en la mayoría de los casos, lo que confirma una administración subretinal exitosa.

Anticuerpos

45 Los anticuerpos primarios utilizados fueron: un anticuerpo políclonal (CSP) anti-Rdh12 de conejo específico para la proteína de ratón (contra 252SPFFKSTSQGAQ263, SEQ ID NO:4), y un anticuerpo monoclonal anti-RDH12 de ratón (2C9) específico para la proteína humana (contra C-284DCKRTWVSPRARNNKT299; SEQ ID NO:5) (Kurth et al. 2007); un anticuerpo monoclonal anti-RHO de ratón (1D4) (MacKenzie et al. 1984); un anticuerpo políclonal anti-RHO de conejo generado contra la proteína desnaturalizada; y un anticuerpo políclonal de conejo anti-opsina de cono roja/verde (Millipore cat# AB5405).

Análisis de inmunotransferencia

50 Las proteínas en los homogeneizados de retina se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que luego se bloquearon, se incubaron con anticuerpo primario durante la noche, se lavaron, se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina y se revelaron utilizando 5-bromo-4-cloro-3'-indolil fosfato p-toluidina y cloruro de nitroazul de tetrazolio.

Histología e Inmunofluorescencia

Los ratones fueron sacrificados, los ojos se puntuaron para orientación y luego se enuclearon. Para las criosecciones, se retiraron el cristalino y los segmentos anteriores, los ojos se fijaron brevemente con paraformaldehído al 4%, se lavaron con PBS, se transfirieron a sacarosa/OCT, se congelaron instantáneamente y se seccionaron a un grosor de 10 µm. Para la preparación de sustitución por congelación, ojos enteros se congelaron instantáneamente en isopentano enfriado con hielo seco durante 30 segundos y luego se transfirieron a metanol enfriado con hielo seco que contenía ácido acético glacial al 3%. Los ojos se incubaron a 80°C durante 48 horas, luego durante la noche a -20°C, se embebieron en parafina y se seccionaron a un grosor de 6 µm. Se desparafinaron las secciones de parafina y se recuperaron los antígenos incubando en 1 mM de EDTA, Tween 20 al 0.05%, pH 8.0, a 90°C durante 30 minutos antes del etiquetado inmunológico de la siguiente manera. Brevemente, se lavaron secciones transversales de retina con PBS y se permeabilizaron con PBS-T (Triton X-100 al 0.3%); se bloquearon con albúmina sérica bovina al 1%, suero de cabra normal al 10% y Triton X-100 al 0.3%; y se incubaron con anticuerpos primarios durante la noche a 4°C, se lavaron y luego se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforo durante 1 hora a temperatura ambiente. Las secciones se cubrieron con cubreobjetos utilizando una montura de gel ProLong Gold que contiene 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Invitrogen) y se tomaron imágenes utilizando un microscopio de fluorescencia Leica DM6000.

Registro de ERG

Los ERG se realizaron como se describió anteriormente (Thompson, 2012) utilizando el sistema de registro Espion e2 (Diagnosys, Lowell, MA). Brevemente, los ratones se adaptaron a la oscuridad durante la noche y se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de ketamina (93 mg/kg) y Xilazina (8 mg/kg). Las pupilas se dilataron con tropicamida tópica (0.5%). La temperatura corporal se mantuvo a 37°C con una almohadilla térmica. Los ERG de la córnea de ambos ojos se registraron utilizando bucles de alambre de oro con anestesia tópica de tetracaína al 0.5% y una gota de metilcelulosa al 2% para la hidratación de la córnea. Se utilizó como referencia un bucle de alambre de oro colocado en la boca, y un electrodo de tierra estaba en la cola. El protocolo de ERG consistió en registrar respuestas adaptadas a la oscuridad (escotópicas) a breves destellos blancos (-2.31 log cd.s.m⁻² para ondas B aisladas de bastones; 1.09 log cd.s.m⁻² para ondas A y B de conos y bastones combinados). Los ERG adaptados a la luz (fotópicos) se registraron después de 10 minutos de adaptación a un fondo blanco de 32 cd.m⁻² de supresión de bastones en respuesta a destellos de intensidad de 1.09 log cd.s.m⁻² (para ondas B aisladas de cono). Las respuestas se amplificaron a una ganancia de 1,000 de 1.25 a 1000 Hz y se digitalizaron a una tasa de 2000 Hz. Se utilizó un filtro de muesca para eliminar el ruido de línea de 60 Hz. Las respuestas se promediaron por computadora y se registraron en intervalos de 3 a 60 segundos dependiendo de la intensidad del estímulo. Para el análisis estadístico, se utilizaron pruebas t pareadas para determinar si las amplitudes de ERG en los ojos tratados eran significativamente diferentes de las de los ojos no tratados.

Análisis de daños inducidos por la luz.

A los ratones albinos *Rdh12^{-/-}* se les inyectó en un ojo con AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 (1.3×10^9 vg), o con un volumen igual de PBS, y los ojos contralaterales no se inyectaron. Seis semanas después de la inyección, se realizó un análisis de ERG y se cuantificaron las respuestas escotópicas como se describió anteriormente. Una semana más tarde, los ratones se adaptaron a la oscuridad durante la noche, se dilataron sus pupilas con tropicamida (0.5%) y luego se colocaron en una caja de luz en bandejas transparentes individuales. Los ratones fueron expuestos a 5,000 lux durante 2 horas y luego fueron devueltos a la vivienda del vivero (12 horas de oscuridad/12 horas de luz (<20 lux)) durante 7 días, después de lo cual se repitió el análisis de ERG. Se calculó para cada ojo el porcentaje de la respuesta al ERG original restante después del daño causado por la luz y se muestran los promedios graficados con errores estándar. Se utilizaron pruebas t pareadas de dos colas para determinar si las amplitudes del ERG en los ojos tratados eran significativamente diferentes de las de los ojos no tratados.

Tomografía de Coherencia Óptica

Los ratones se anestesiaron y se dilataron las pupilas con tropicamida al 0.5%. Se centró en la cabeza del nervio óptico un sistema de tomografía de coherencia óptica (OCT) de dominio espectral (sistema Bioptigen Envisu R2200 SD-OCT (Durham, NC, USA)), con un tamaño de análisis de volumen de 1.4 × 1.4 mm. Se utilizaron gotas lubricantes Systane (Alcon) durante todo el proceso de obtención de imágenes.

Análisis del contenido de retinoides.

Se extrajeron de los ojos de ratón *todo-trans* retinal y 11-*cis* retinal utilizando una modificación de un método descrito previamente (Bligh and Dyer, 1959). Seis semanas después de la inyección, los ratones se adaptaron a la oscuridad durante la noche y luego, bajo luz roja tenue, se sacrificaron mediante sobredosis de CO₂, y los ojos se enuclearon y se congelaron en N₂ líquido. Bajo luz roja tenue y sobre hielo, cada ojo se homogeneizó en 1 mL de cloroformo: metanol: hidroxilamina (2 M) (3:6:1) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. A continuación, se añadieron 200 µL de cloroformo y 240 µL de agua, y cada muestra se agitó con vórtex y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos. Se recolectó la fase inferior, se evaporó el solvente bajo

nitrógeno y la muestra se disolvió en hexano. Los retinoides en los extractos se identificaron y cuantificaron mediante análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), utilizando un módulo de separación Waters Alliance y un detector de arreglos de fotodiodo con una columna Supelcosil LC-31 (25 cm por 4.6 mm por 3 µm) revelada con 1,4-dioxano al 5% en hexano. La identificación de picos se realizó mediante la comparación a los tiempos de retención de compuestos estándar y evaluación de longitudes de onda máximas. El análisis cuantitativo se realizó comparando las áreas de los picos a 347 y 351 nm para sin- y oxíma de anti-11-cis retinal, respectivamente, y a 357 y 361 nm para sin- y oxíma de anti-todo-trans retinal, respectivamente (Kurth et al. 2007).

Ensayo de actividad de la retinal reductasa

Se analizó la actividad de la retinal reductasa en homogeneizados de retina de ratón 6 semanas después de la inyección. Se sacrificaron ratones adaptados a la luz y cada retina se homogeneizó individualmente en 125 µL de 0.25 M de sacarosa, 25 mM de Tris-acetato, pH 7, 1 mM de ditiotreitol. Los homogeneizados se centrifugaron a 1000 x g durante 5 minutos para eliminar las células sin romper y luego los sobrenadantes se sonicaron con una sonda con micropunta (30 veces durante 1 segundo cada una) en hielo. Las concentraciones de proteínas se determinaron mediante una modificación al procedimiento de Lowry (Peterson et al. 1977), y los niveles de RDH12 se evaluaron mediante inmunodetección. Se agruparon muestras similares y se analizaron 20 µg de cada lisado agrupado (por triplicado) en amortiguador que contiene 200 µM de todo-trans retinal y 200 µM de NADPH en amortiguador HEPES (pH 8); Las reacciones se incubaron durante 0-45 minutos en un baño de agua a 37°C (una temperatura de reacción que minimizó la isomerización térmica de los sustratos retinoides, así como la inactivación de enzimas). La formación de todo-trans retinol se cuantificó utilizando análisis por HPLC de fase normal en comparación con estándares conocidos (Chrispell et al. 2009).

Ejemplo 1

Expresión de RDH12 de humano mediada por AAV

Se desarrollaron y probaron una variedad de vectores para la terapia de reemplazo de RDH12. La construcción del vector de RDH12 óptima se muestra en la Figura 2A. Comprende el ADNc de RDH12 de humano bajo el control de un fragmento del promotor de la Rodopsina Cinasa humana (GRK1). La construcción está empaquetada en un serotipo AAV2/5. Se ha demostrado que la cápside de AAV del serotipo 5 media la transducción de fotorreceptores, pero con cinéticas más lentas y una expresión menos robusta en comparación con la cápside de AAV8 (Yang et al. 2002; Lotery et al. 2003; Allocat et al. 2007; Lebherz et al. 2008). La expresión de la proteína RDH12 de humano en retinas de ratón 6 semanas después de la inyección subretinal de AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 (1.3×10^9 vg) se evaluó utilizando anticuerpos específicos para las proteínas Rdh12 de ratón o RDH12 de humano. Los niveles de RDH12 de humano administrados por vector parecen ser aproximadamente comparables a la cantidad de Rdh12 de ratón (Figura 2B). Se utilizó imagenología de inmunofluorescencia indirecta en secciones de retina para evaluar Rdh12 de ratón nativa y RDH12 de humano recombinante, utilizando anticuerpos específicos de especie. La localización de RDH12 endógena y recombinante parece ser idéntica, lo que indica que la proteína se está procesando normalmente (Figura 2C).

La capacidad de las retinas de los ratones *Rdh12^{-/-}* para reducir retinaldehídos exógenos se reduce significativamente en comparación con los ratones de tipo silvestre (Chrispell et al. 2009). Seis semanas después de la inyección subretinal de 1.3×10^9 vg de AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 en ratones *Rdh12^{-/-}*, se analizaron homogeneizados de retina para determinar *in vitro* la actividad de la retinal reductasa. La formación de todo-trans retinol se cuantificó utilizando análisis por HPLC de fase normal. Cada punto de datos representa la media ± error estándar para un mínimo de 5 experimentos independientes donde se agruparon y analizaron retinas de 3 a 5 ratones por triplicado. Las tasas iniciales de la formación de todo-trans retinol en retinas de ratones *Rdh12^{-/-}* y C57BL/6J no inyectados fueron 0.013 pmol minuto⁻¹ µg de proteína⁻¹ y 0.071 pmol minuto⁻¹ µg de proteína⁻¹, respectivamente (Figura 3A). La actividad residual presente en ratones *Rdh12^{-/-}* refleja la presencia de otras isoformas de RDH que son capaces de reducir a todo-trans retinal (Rattner et al. 2000; Haeseleer et al. 2002). En ratones *Rdh12^{-/-}* inyectados con AAV2/5-hGRK1p.hRDH12, la tasa de formación de todo-trans retinol de 0.046 pmol minuto⁻¹ µg de proteína⁻¹ fue significativamente mayor que para ratones *Rdh12^{-/-}* inyectados con PBS (0.016 pmol minuto⁻¹ µg de proteína⁻¹). La recuperación de la actividad de la retinal reductasa (alrededor del 50%) es consistente con la transducción parcial de la retina (alrededor del 30%) e indicó que el vector restableció los niveles normales de actividad en los fotorreceptores transducidos. El transgén se expresó durante más de 12 meses (el punto de tiempo más largo examinado). El etiquetado por inmunofluorescencia mostró el grado de transducción de la retina y la expresión de RDH12 recombinante en un ratón *Rdh12^{-/-}* evaluado 16 semanas después de la inyección, cubriendo aproximadamente un tercio de la superficie de la retina (Figura 3B).

Se evaluó el efecto de AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 sobre la susceptibilidad al daño inducido por la luz en ratones albinos *Rdh12^{-/-}* a los que se les inyectó en un ojo con 1.3×10^9 vg o un volumen igual de PBS, y no recibieron tratamiento en el ojo contralateral. El análisis de ERG de la actividad retinal escotópica (bastones aislados y conos y bastones combinados) se realizó 1 semana antes y 1 semana después, sometiendo a los ratones a niveles de luz que causan un daño a la retina significativo en animales albinos (5,000 lux durante 2 horas). El

porcentaje de actividad retinal restante en los ojos tratados con vector fue significativamente mayor que el restante en los ojos no tratados ($p \leq 0.0168$) (Figura 4). Por el contrario, en los animales de control inyectados con PBS, el porcentaje de actividad retinal escotópica restante en los ojos no inyectados no fue significativamente mayor que en los ojos no tratados ($p \geq 0.2255$). Estos hallazgos son consistentes con la protección mediada por AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 contra una mayor susceptibilidad al daño inducido por la luz asociado con la deficiencia de RDH12.

La toxicidad del vector se evaluó mediante el efecto directo de la actividad de RDH12 de humano sobre el metabolismo de los retinoides y para efectos indirectos sobre la estructura y función de la retina, como se describe en el siguiente pasaje.

La amplia especificidad de sustrato de RDH12 que permite la reducción de 11-cis retinal y de todo-trans retinal creó el potencial para sobreexpresión o localización errónea de la proteína recombinante para impactar negativamente la función del ciclo visual. Se utilizó el análisis mediante HPLC del contenido de retinoides para evaluar la actividad del ciclo visual en ojos de ratones *Rdh12^{-/-}* inyectados con AAV2/5-hGRK1p.hRDH12, o con PBS, o de controles C57BL/6J no inyectados. Análisis de retinoides 6 semanas después de la inyección subretinal de AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 (1.3×10^9 vg) en ratones *Rdh12^{-/-}* mostraron que la expresión de hRDH12 no afectó significativamente los niveles estacionarios de 11-cis retinal en la retina (Figura 5A). Un cromatograma representativo muestra diversos controles con tiempos de elución indicados para diversos retinoides. Niveles totales retinales de 11-cis retinal y todo-trans retinal representan valores promedio ± error estándar para un mínimo de 5 experimentos independientes (Figuras 5B, C). Las respuestas de ERG de la actividad retinal se midieron en ratones C57BL/6J y *Rdh12^{-/-}* que recibieron 1.3×10^9 vg de AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 y se mantuvieron en la vivienda del vivero (12 horas de oscuridad/12 horas de luz (<20 lux)). Las respuestas escotópicas (estímulo de -2.3 log cd.s.m⁻² aislado de bastón), conos y bastones combinados (estímulo de 1.09 log cd.sm⁻²), y fotópicas (mediadas por conos, estímulo de 1.09 log cd.s.m⁻²) de los ERG de un animal representativo en cada grupo de tratamiento medidas 6 semanas después de la inyección no mostraron ningún efecto significativo en la expresión de RDH12 de humano sobre la función de la retina (Figura 6).

La localización errónea de rodopsina y opsina de cono es un indicador bien caracterizado de disminución de la viabilidad de las células fotorreceptoras (Adamian et al. 2006; Turney et al. 2007; Brunner, et al. 2010; Lopes et al. 2010). La localización inmunohistoquímica de rodopsina y opsina roja/verde se evaluó en ratones *Rdh12^{-/-}* que no fueron inyectados o que fueron inyectados con AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 (1.3×10^9 vg). En ratones que exhibieron expresión transgénica robusta, no se observó ninguna disminución en los niveles de expresión de opsina ni evidencia de localización errónea de opsina en bastones y conos 16 semanas después del tratamiento; la estructura de la retina permaneció intacta 54 semanas después de la inyección (Figura 7).

El análisis de tomografía de coherencia óptica (OCT) de ratones C57BL/6J y *Rdh12^{-/-}* evaluados 54 semanas después de la inyección de AAV2/5-hGRK1p.hRDH12 (2×10^9 vg) no mostró alteraciones importantes en la laminación de la retina a lo largo de un área amplia que incluye ambos lados del nervio óptico. La estructura de la retina se mantuvo estable durante al menos un año después de la inyección en comparación con los ojos contralaterales no inyectados (Figura 8).

Ejemplo 2. Daño a la retina causado por AAV2/8

Daño a la retina en ratones inyectados con AAV2/8-hGRK1p.hRDH12.

Se ha demostrado que una cápside derivada de AAV del serotipo 8 media la transducción eficiente y robusta de células fotorreceptoras (Allocca et al. 2007; Natkunarajah et al. 2008; Vandenberghe et al. 2011; Vandenberghe et al. 2013). Los estudios iniciales se realizaron con un serotipo AAV2/8 que porta la construcción del vector descrita anteriormente. Los ratones *Rdh12^{-/-}* tratados mediante inyección subretinal de AAV2/8-hGRK1p.hRDH12 en dosis de $10^8\text{--}10^9$ genomas virales (vg) dieron como resultado una expresión robusta de la proteína RDH12 de humano recombinante. Sin embargo, los ojos inyectados desarrollaron daño a la retina significativo tan pronto como 3 semanas después de la inyección, y en casi todos los casos 6 semanas después de la inyección. La infiltración de macrófagos se observó en la mayoría de los casos por la presencia de células CD68⁺ (Figura 9). El daño a la retina no fue mitigado por la administración sistémica de ciclosporina (Borel et al. 1976) a ratones *Rdh12^{-/-}* continuamente desde el momento del destete hasta el momento del sacrificio, lo que indica que las respuestas inmunes contra el vector o el transgén no fueron la causa del daño. Esta visión es consistente con los resultados obtenidos en ratones C57BL/6J de tipo silvestre inyectados con construcciones que codifican para ya sea RDH12 de humano (AAV2/8-hGRK1p.hRDH12) o *Rdh12* de ratón (AAV2/8-hGRK1p.mRdh12), en los cuales también se produjo un adelgazamiento significativo de la retina y una infiltración de macrófagos 6 semanas después de la inyección.

Referencias

- ADAMIAN M, PAWLYK BS, HONG DH, BERSON EL. (2006). Rod and cone opsin mislocalization in an autopsy eye from a carrier of X-linked retinitis pigmentosa with a Gly436Asp mutation in the RPGR gene. *Am J Ophthalmol* 142, 515-8.
- ACLAND GM, AGUIRRE GD, RAY J, ZHANG Q, et al. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 28, 92-5.
- ALEXANDER JJ, UMINO Y, EVERHART D, CHANG B, et al. (2007). Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia. *Nat Med* 13, 685-7.
- ALI RR, SARRA GM, STEPHENS C, ALWIS MD, et al. (2000). Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet* 25, 306-10.
- 10 ALLOCCA M, MUSSOLINO C, GARCIA-HOYOS M, SANGES D, et al. (2007). Novel adeno- associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virol* 81, 11372-80.
- BAINB RIDGE JW, SMITH AJ, BARKER SS, ROBBIE S, et al. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358, 2231-9.
- 15 BELTRAN WA, CIDECIYAN AV, LEWIN AS, IWABE S, et al. (2012). Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 2132-7.
- BEN-SHABAT S, PARISH CA, HASHIMOTO M, LIU J, et al. (2001). Fluorescent pigments of the retinal pigment epithelium and age-related macular degeneration. *Bioorg Med Chem Lett* 11, 1533-40.
- 20 BELYAEVA OV, KORKINA OV, STETSENKO AV, KIM T, et al. (2005). Biochemical properties of purified human retinol dehydrogenase 12 (RDH12): catalytic efficiency toward retinoids and C9 aldehydes and effects of cellular retinol-binding protein type I (CRBPI) and cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP) on the oxidation and reduction of retinoids. *Biochemistry* 44, 7035-47.
- BLIGH EG, DYER WJ. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37, 911-7.
- 25 BOREL JF, FEURER C, GUBLER HU, STÄHELIN H. (1976). Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6, 468-75.
- BRUNNER S, SKOSYRSKI S, KIRSCHNER-SCHWABE R, KNOBELOCH KP, et al. (2010). Cone versus rod disease in a mutant Rpgr mouse caused by different genetic backgrounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 1106-15.
- 30 CARLSON NB, KURTZ D, HEATH DA, HINES C. in: *Clinical Procedures for Ocular Examination*. 3rd Ed. Appleton & Lange, Norwalk, Conn.; 1990:63-77.
- CHEN C, THOMPSON DA, KOUTALOS Y. (2012). Reduction of all-trans-retinal in vertebrate rod photoreceptors requires the combined action of RDH8 and RDH12. *J Biol Chem*, 287, 24662-70.
- 35 CHEN Y, OKANO K, MAEDA T, CHAUHAN V, et al. (2012). Mechanism of all-trans-retinal toxicity with implications for stargardt disease and age-related macular degeneration. *J Biol Chem* 287, 5059-69.
- CHRISPPELL JD, FEATHERS KL, KANE MA, KIM, CY, et al. (2009). Rdh12 activity and effects on retinoid processing in the murine retina. *J Biol Chem* 284, 21468-77.
- 40 CIDECIYAN AV, ALEMAN TS, BOYE SL, SCHWARTZ SB, et al. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 151 12-7.
- DEN HOLLANDER AI, ROEPMAN R, KOENEKOOP RK, CREMERS FP. (2008). Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* 27, 391-419.
- FLOTTE TR, SOLOW R, OWENS RA, AFIONE S, et al. (1992). Gene expression from adeno-associated virus vectors in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 7, 349-56.
- 45 FLOTTE TR, AFIONE SA, SOLOW R, DRUMM ML, et al. (1993). Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem* 268, 3781-90.
- HAESELEER F, JANG GF, IMANISHI Y, DRIESSEN CA, et al. (2002). Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *J Biol Chem* 277, 45537-46.

- HERMONAT PL, MUZYCZKA N. (1984). Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 6466-70.
- JANECKE AR, THOMPSON DA, UTERMANN G, BECKER C, et al. (2004). Mutations in RDH12 encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat Genet* 36, 850-854.
- JOHNSON DD. *Deafness and Vision Disorders: Anatomy and Physiology, Assessment Procedures, Ocular Anomalies, and Educational Implications*, Charles C. Thomas Publisher; 1999.
- KELLER B, ADAMSKI J. (2007). RDH12, a retinol dehydrogenase causing Leber's congenital amaurosis, is also involved in steroid metabolism. *J Steroid Biochem Mol Biol* 104, 190-4.
- KHANI SC, PAWLYK BS, BULGAKOV OV, KASPEREK E, et al. (2007). AAV-mediated expression targeting of rod and cone photoreceptors with a human rhodopsin kinase promoter. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 3954-61.
- KOENEKOOP RK. (2004). An overview of Leber congenital amaurosis: a model to understand human retinal development. *Sury Ophthalmol* 49, 379-98.
- KOMAROMY AM, ALEXANDER JJ, ROWLAN JS, GARCIA MM, et al. (2010). Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia. *Hum Mol Genet* 19, 2581-93.
- KUMARAN N, MOORE AT, WELEBER RG, MICHAELIDES M. (2017). Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions. *Br J Ophthalmol* 101, 1147-1154.
- KURTH I, THOMPSON DA, RUTHER K, FEATHERS KL, et al. (2007). Targeted disruption of the murine retinal dehydrogenase gene Rdh12 does not limit visual cycle function. *Mol Cell Biol* 27, 1370-9.
- LEBHERZ C, MAGUIRE A, TANG W, BENNETT J, et al. (2008). Novel AAV serotypes for improved ocular gene transfer. *J Gene Med* 10, 375-82.
- LEE SA, BELYAEVA OV, KEDISHVILI NY. (2008). Effect of lipid peroxidation products on the activity of human retinol dehydrogenase 12 (RDH12) and retinoid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1782, 421-5.
- LHERITEAU E, LIBEAU L, STIEGER K, DESCHAMPS JY, et al. (2009). The RPGRIP 1-deficient dog, a promising canine model for gene therapy. *Mol Vis* 15, 349-61.
- LOPES VS, JIMENO D, KHANOBDEE K, SONG X, et al. (2010). Dysfunction of heterotrimeric kinesin-2 in rod photoreceptor cells and the role of opsin mislocalization in rapid cell death. *Mol Biol Cell* 21, 4076-88.
- LOTERY A, YANG G, MULLINS R, RUSSELL SR, et al. (2003). Adeno-associated virus type 5: transduction efficiency and cell-type specificity in the primate retina. *Hum Gene Ther* 14, 1663-71.
- MACKAY DS, DEV BORMAN A, MORADI P, HENDERSON HR, et al. (2011). RDH12 retinopathy: novel mutations and phenotypic description. *Mol Vis* 17, 2706-16.
- MAEDAA, MAEDAT, IMANISHI Y, SUN W, et al. Retinol dehydrogenase (RDH12) protects photoreceptors from light-induced degeneration in mice. *J Biol Chem* 281, 37697-704.
- MAGUIRE AM, SIMONELLI F, PIERCE EA, PUGH EN, JR., et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med* 358, 2240-8.
- MARCHETTE LD, THOMPSON DA, KRAVTSOVA M, NGANSOP TN, et al. (2010). Retinol dehydrogenase 12 detoxifies 4-hydroxyneonenal in photoreceptor cells. *Free Radic Biol Med* 48, 16-25.
- MCLAUGHLIN SK, COLLIS P, HERMONAT PL, MUZYCZKA N. (1988). Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol* 62, 1963-73.
- MACKENZIE D, ARENDT A, HARGRAVE P, McDOWELL JH, et al. (1984). Localization of binding sites for carboxyl terminal specific anti-rhodopsin monoclonal antibodies using synthetic peptides. *Biochemistry* 23, 6544-9.
- MACLAREN RE, GROPPE M, BARNARD AR, COTTRIALL CL, et al. (2014). Retinal gene therapy in patients with choroideremia: initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *Lancet* 383, 1129-37.
- MUZYCZKA N. (1992). Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 158, 97-129.

- NATKUNARAJAH M, TRITTIBACH P, MCINTOSH J, DURAN Y, et al. (2008). Assessment of ocular transduction using single-stranded and self-complementary recombinant adeno- associated virus serotype 2/8. *Gene Ther* 15, 463-7.
- 5 NISHIGUCHI KM, CARVALHO LS, RIZZI M, POWELL K, et al. (2015). Gene therapy restores vision in rd1 mice after removal of a confounding mutation in Gpr179. *Nat Commun* 6, 6006. PANG J J, LEI L, DAI X, SHI W, et al. (2012). AAV-mediated gene therapy in mouse models of recessive retinal degeneration. *Curr Mol Med* 12, 316-30.
- 10 PAWLYK BS, SMITH AJ, BUCH PK, ADAMIAN M, et al. (2005). Gene replacement therapy rescues photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis lacking RPGRIP. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 3039-45.
- PAWLYK BS, BULGAKOV OV, LIU X, XU X, et al. (2010). Replacement gene therapy with a human RPGRIP1 sequence slows photoreceptor degeneration in a murine model of Leber congenital amaurosis. *Hum Gene Ther* 21, 993-1004.
- 15 PERRAULT I, HANEIN S, GERBER S, BARBET F, et al. (2004). Retinal dehydrogenase 12 (RDH12) mutations in leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet* 75, 639-46.
- PETERSON GL. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83, 346-56.
- 20 RATTNER A, SMALLWOOD PM, NATHANS J. (2000). Identification and characterization of all-trans-retinol dehydrogenase from photoreceptor outer segments, the visual cycle enzyme that reduces all-trans-retinal to all-trans-retinol. *J Biol Chem* 275, 11034-43.
- SAMULSKI RJ, CHANG LS, SHENK T. (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno- associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63, 3822-8.
- SCHUSTER A, JANECKE AR, WILKE R, SCHMID E, et al. (2007). The phenotype of early- onset retinal degeneration in persons with RDH12 mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 1824-31.
- 25 SPARROW JR. (2010). Bisretinoids of RPE lipofuscin: trigger for complement activation in age-related macular degeneration. *Adv Exp Med Biol* 703, 63-74.
- SUN X, PAWLYK B, XU X, LIU X, et al. (2010). Gene therapy with a promoter targeting both rods and cones rescues retinal degeneration caused by AIPL1 mutations. *Gene Ther* 17, 117-31. TAN M H, SMITH A J, PAWLYK B, XU X, et al. (2009). Gene therapy for retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis caused by defects in AIPL1: effective rescue of mouse models of partial and complete Aipll deficiency using AAV2/2 and AAV2/8 vectors. *Hum Mol Genet*.
- 30 THOMPSON DA, GAL A. (2003). Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Prog Retin Eye Res* 22, 683-703.
- THOMPSON DA, JANECKE AR, LANGE J, FEATHERS KL, et al. (2005). Retinal degeneration associated with RDH12 mutations results from decreased 11-cis retinal synthesis due to disruption of the visual cycle. *Hum Mol Genet* 14, 3865-75.
- 35 THOMPSON D A, KHAN N W, OTHMAN M I, CHANG B, et al. (2012). Rd9 is a naturally occurring mouse model of a common form of retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR-ORF15. *PLoS One* 7, e35865.
- TRATSCHIN JD, WEST MH, SANDBANK T, CARTER BJ. (1984a). A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase. *Mol Cell Biol* 4, 2072-81.
- 40 TRATSCHIN JD, MILLER IL, CARTER BJ. (1984b). Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J Virol* 51, 611-9.
- TRATSCHIN JD, MILLER IL, SMITH MG, CARTER BJ. (1985). Adeno-associated virus vector for high-frequency integration, expression, and rescue of genes in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 5, 3251-60.
- TURNEY C, CHONG NH, ALEXANDER RA, HOGG CR, et al. (2007). Pathological and electrophysiological features of a canine cone-rod dystrophy in the miniature longhaired dachshund. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 4240-9.
- 50 VANDENBERGHE LH, BELL P, MAGUIRE AM, CEARLEY CN, et al. (2011). Dosage thresholds for AAV2 and AAV8 photoreceptor gene therapy in monkey. *Sci Transl Med* 3, 88ra54.

VANDENBERGHE LH, BELL P, MAGUIRE AM, XIAO R, et al. (2013). AAV9 targets cone photoreceptors in the nonhuman primate retina. *PLoS One* 8, e53463.

XIAO X, LI J, SAMULSKI RJ. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72, 2224-32.

5 YANG GS, SCHMIDT M, YAN Z, LINDBLOOM JD, et al. (2002). Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol* 76, 7651-60.

YOUNG JE, VOGT T, GROSS KW, KHANI SC. (2003). A short, highly active photoreceptor-specific enhancer/promoter region upstream of the human rhodopsin kinase gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 4076-85.

10 WELEBER RG, FRANCIS PJ, TRZUPEK KM, BEATTIE C. (2004). Leber Congenital Amaurosis. In: PAGON R A, ADAM M P, ARDINGER H H, WALLACE S E, et al. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017. [updated 2013 May 2].

15 WONDISFORD FE, USALA SJ, DECHERNEY GS, CASTREN M, et al. (1988). Cloning of the human thyrotropin beta-subunit gene and transient expression of biologically active human thyrotropin after gene transfection. *Mol Endocrinol* 2, 32-9.

REIVINDICACIONES

1. Un vector viral adenoasociado que comprende un ácido nucleico, en el que el ácido nucleico comprende ADN de RDH12 de humano y en el que el ADN de RDH12 de humano codifica para una proteína que es al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 99% idéntica a la longitud completa de SEQ ID NO:2 para uso en un método para tratar a un sujeto humano que tiene una afección oftalmológica debido a una o más mutaciones de pérdida de la función en el gen que codifica para la proteína Retinol Deshidrogenasa 12 (RDH12), comprendiendo el método administrar el vector viral adenoasociado a al menos un ojo del sujeto, en el que el vector viral adenoasociado es AAV-2, serotipo 5 (AAV2/5), en el que el ADN de RDH12 está bajo el control de la expresión de un promotor de rodopsina cinasa humana 1 (hGRK1), y en el que la afección oftalmológica es Amaurosis Congénita de Leber (LCA).
5
2. El vector viral adenoasociado para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el promotor de hGRK1 comprende SEQ ID NO:3, o
en el que el ADN de RDH12 comprende una secuencia que es al menos 60% o 70% idéntica a SEQ ID NO:1,
10 o
en el que el ADN de RDH12 comprende administrar el ácido nucleico a un título de alrededor de 2×10^{10} genomas virales por mililitro (vg/mL) hasta un título de alrededor de 2×10^{12} vg/mL, o
en el que el ácido nucleico se administra en el espacio subretinal.
15
3. El vector viral adenoasociado para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el ácido nucleico se administra en el espacio subretinal con una cánula de microinyección que se inserta en el espacio subretinal.
20
4. El vector viral adenoasociado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el ADN de RDH12 de humano codifica para una proteína que comprende SEQ ID NO:2 y en el que el promotor de hGRK1 consiste en SEQ ID NO:3.
25
5. Un vector viral adenoasociado que comprende un ácido nucleico que codifica para un ADN de RDH12 de humano, en el que el ADN de RDH12 de humano codifica para una proteína que es al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 99% idéntica a la longitud completa de SEQ ID NO:2, en el que el ADN de RDH12 está bajo el control de un promotor de rodopsina cinasa humana 1 (hGRK1), y en el que el vector viral adenoasociado es AAV-2, serotipo-5 (AAV2/5).
30
6. El vector viral adenoasociado de la reivindicación 5, en el que el promotor de hGRK1 comprende SEQ ID NO:3, o en el que el ADN de RDH12 de humano codifica para una proteína que comprende SEQ ID NO:2.
35
7. El vector viral adenoasociado de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en el que el promotor de hGRK1 consiste en SEQ ID NO:3.
8. El vector viral adenoasociado de la reivindicación 5, en el que el ADN de RDH12 de humano es al menos 60% o 70% idéntico a la longitud completa de SEQ ID NO: 1.
9. Una célula hospedera aislada que comprende el vector viral adenoasociado de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8.
10. La célula hospedera aislada de la reivindicación 9, en la que la célula expresa una proteína RDH12 de humano.

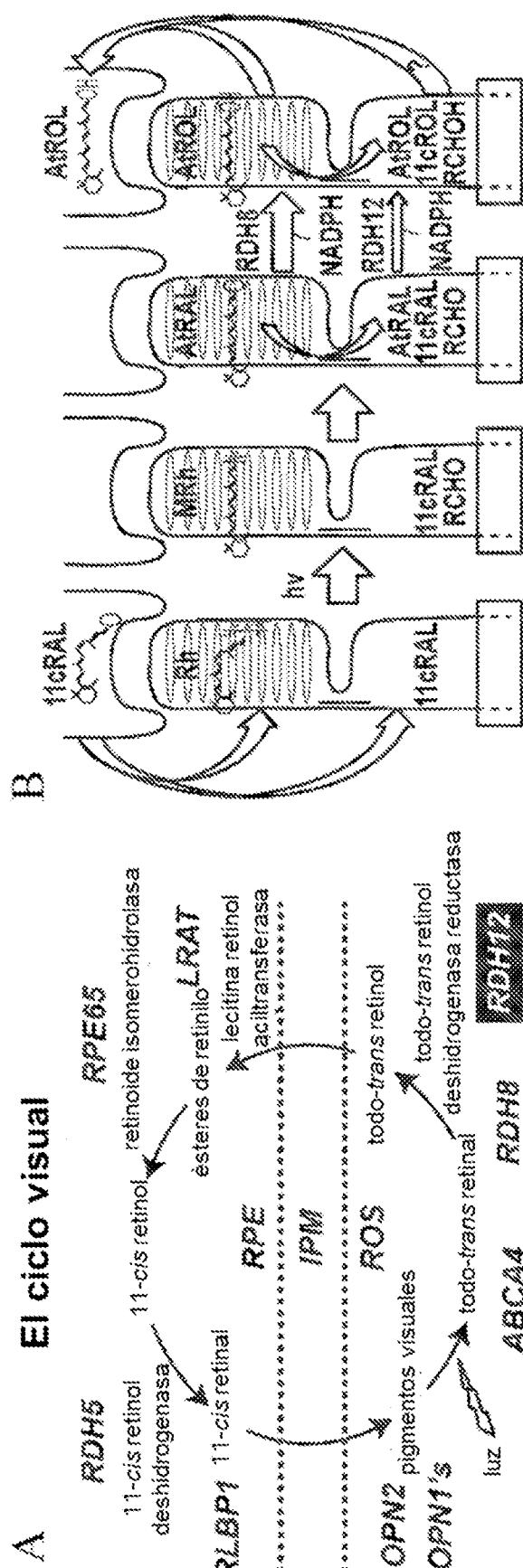


Figura 1

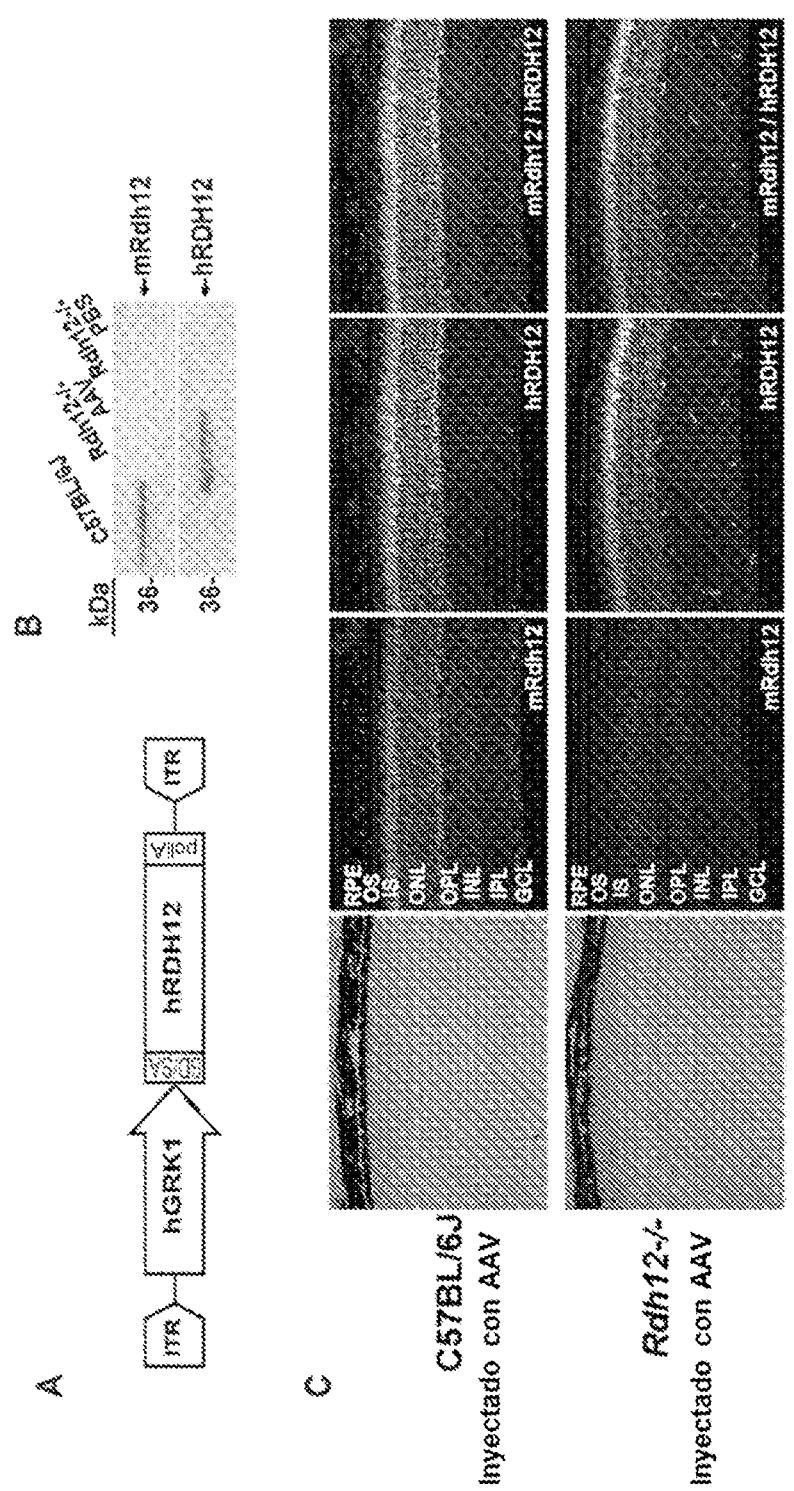


Figura 2

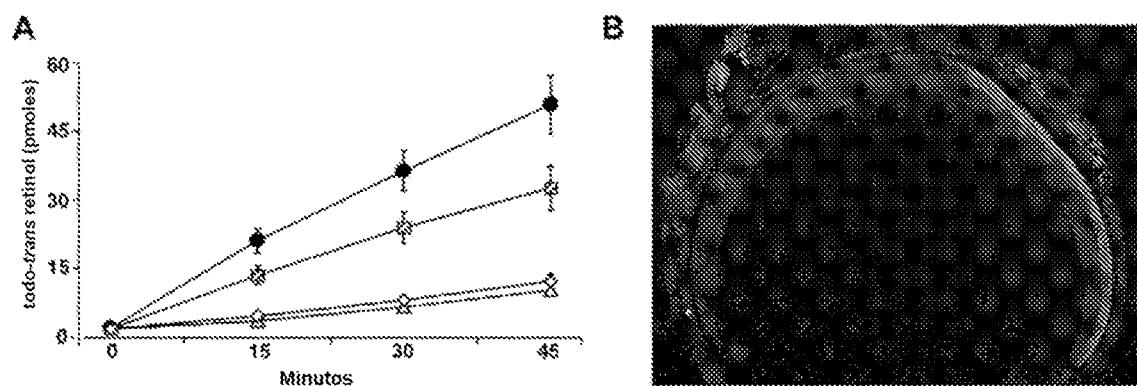


Figura 3

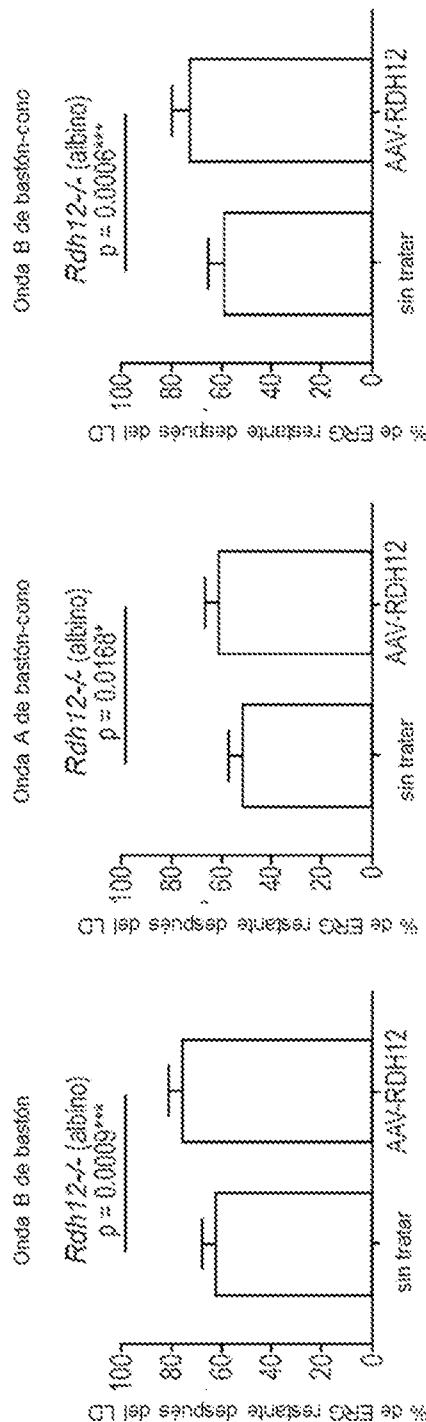


Figura 4

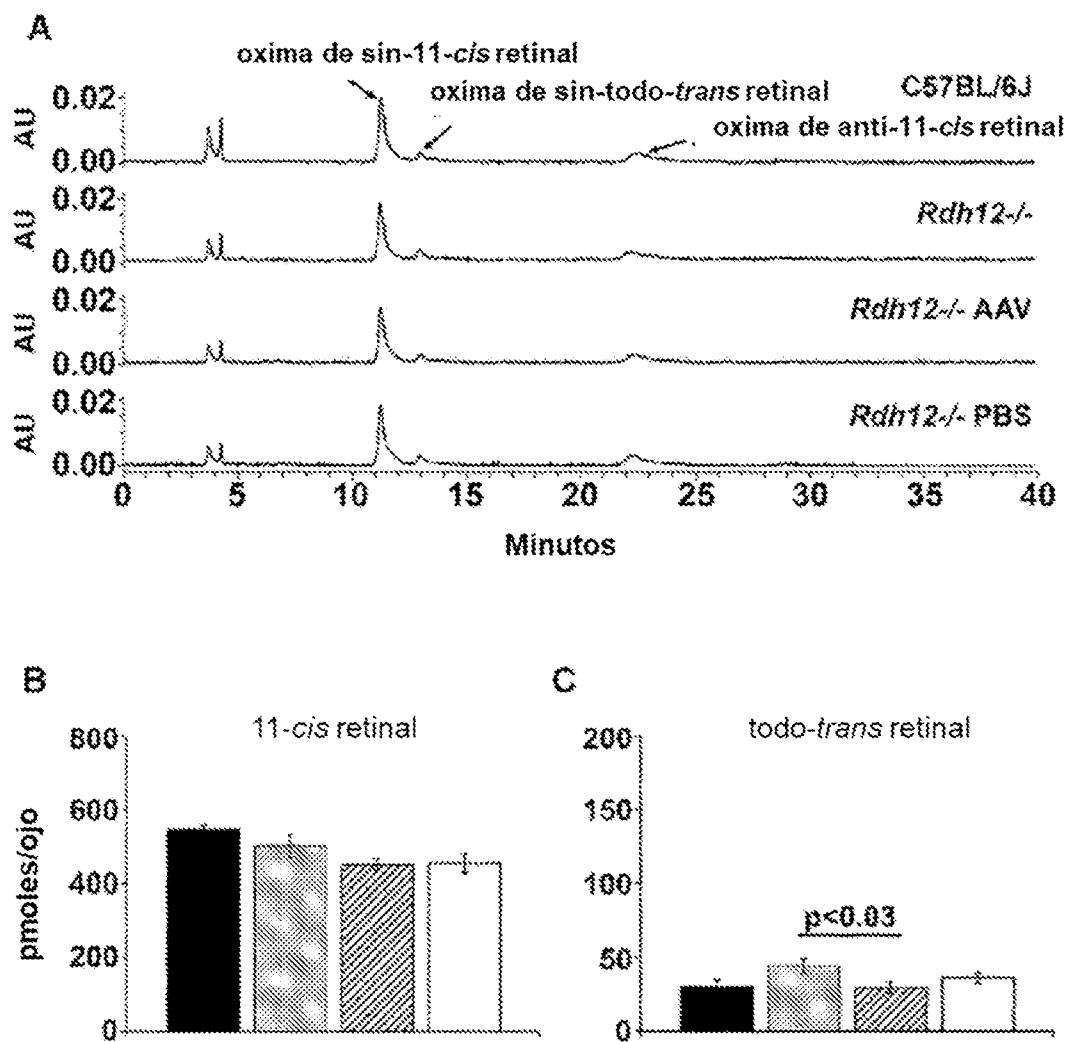


Figura 5

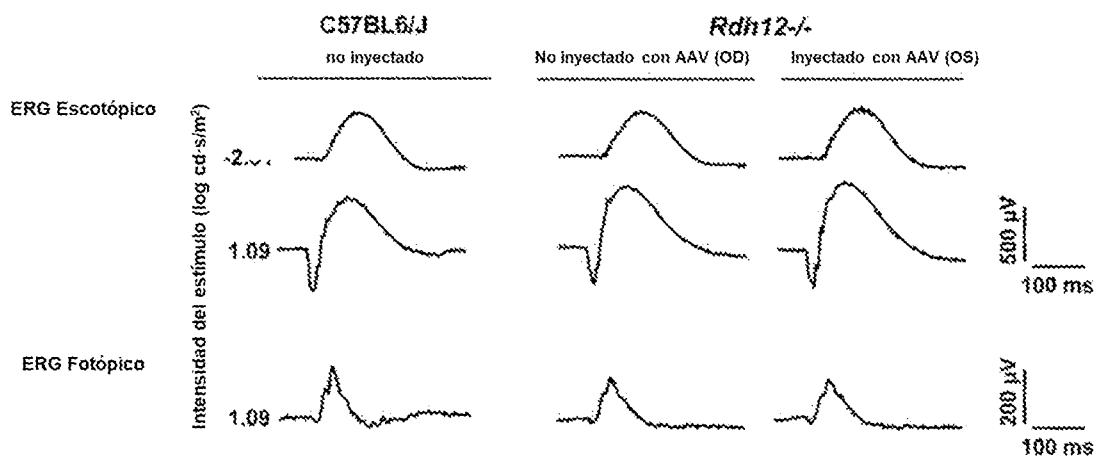


Figura 6

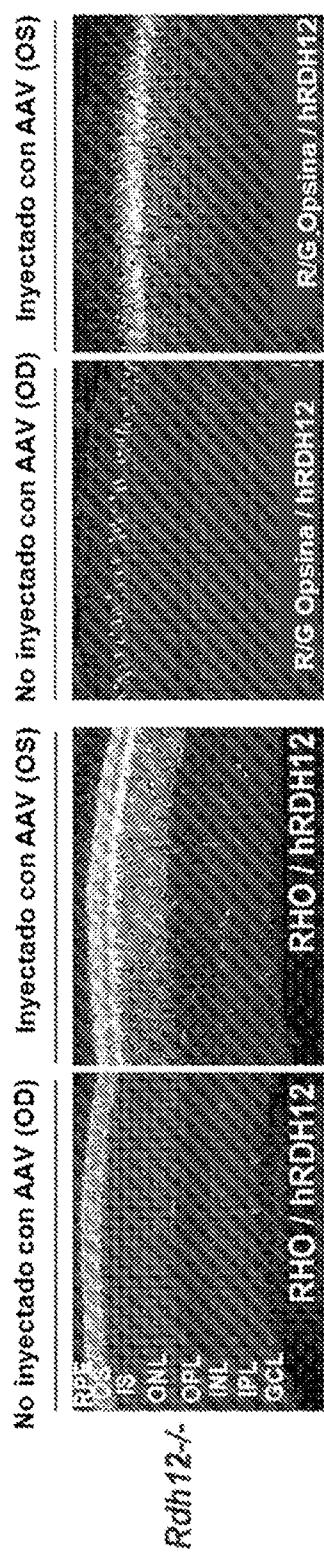


Figura 7

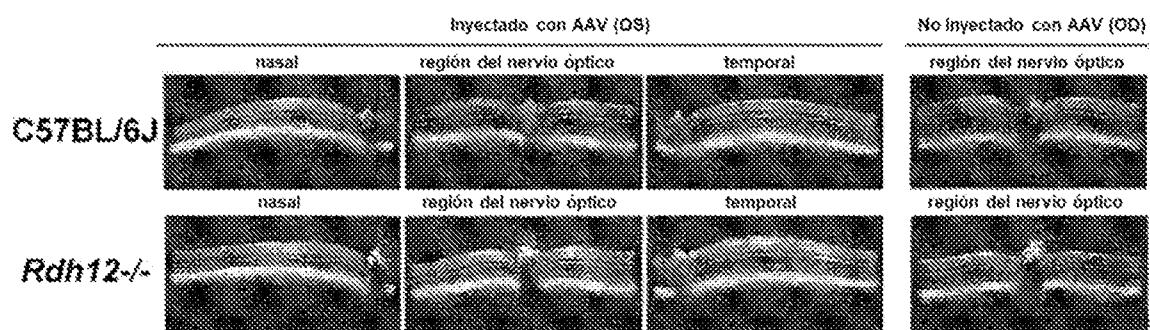


Figura 8

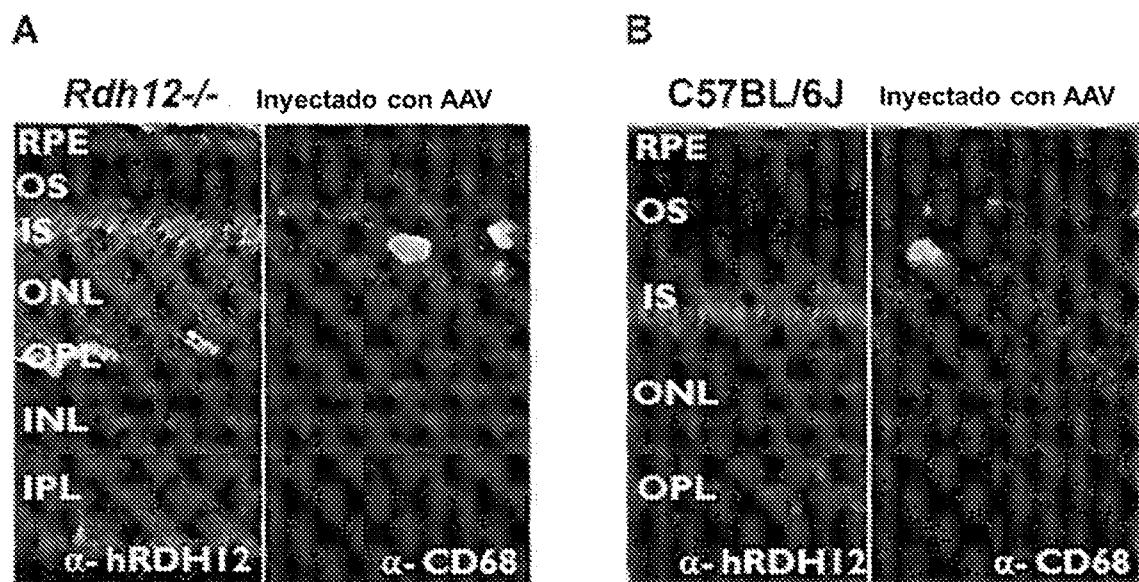


Figura 9