

Minutas de la reunión de la Junta-Consejo Científica y Médica de Retina International

Fecha: Lunes, 6 Mayo 2013, 1:00-2:30 pm

Lugar de celebración: ARVO reunión anual, Seattle, WA USA

RI President: Ms. Christina Fasser

SMAB co-chairmen: Drs. Eberhart Zrenner and Joe Hollyfield

SMAB Secretary: Dr. Jerry Chader

Ponentes científicos invitados:

Dr. Jose-Alain Sahel, Dr. Markus Groppe, Dr. Artur Cideciyan, Dr. Shuichi Yamamoto , Dr. Robin Ali, Dr. Thomas Reh, Dr. Gustavo Aguirre, Dr. Alan Bird, Dr. Steven Schwartz, Dr. Muna Naash, Dr. peter Kador, Dr. Emily Chew, Dr. Eberhart Zrenner, Dr. Ivan Tochitsky, Dr. Serge Picaud, Dr. Frans Cremers

Otros participantes:

Audo, I., Andreasson, S., Banfi, S., Barnes, R., Boneo, B., Bragadottir, R., Brint, D., Carmichael, T., Cuenca, N., Dryja, T., Flannery, J., Fletcher, E., Grill, C., Hamel, C., Humphries, M., Humphries, P., Kjellstrom, S., Klaver, C., Kondo, M., Laties, A., LaVail, M., Leroy, B., Lorenz, B., Michaelides, M., Molday, R., Moser, E., Munier, F., Neidhard, J., Palmer A., Pierce, E., Pinilla, I., Porto, F., Preising, M., Richman, E., Rudanko, S.-L., Sallum, J., Sankila, E.-M., Schorderet, D., Shaberman, B., Sharp, D., Simonilli, F., Stell, W., Tsilimbaris, M., Tumminia, S., Valim, M., Vincent, A., Worsley, D., Zangerl, B., Zinkernagel, M.

A) Introducción

- Ms. Christina Fasser abrió la reunión dando la bienvenida a todos los participantes a la conferencia 2013 de RI Junta-Consejo Científico-Médico.
- Después de unos comentarios de procedimiento, pasó la palabra a Dr. Joe Hollyield para moderar el programa científico.

B) Programa Científico

Retinosis Pigmentaria y Enfermedades Raras

1) Tratamiento de síndrome Usher Tipo 1.

Dr. Jose-Alain Sahel

Centre Hospitalier Nationale d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts, París, Francia

Síndrome Usher (USH) es la más frecuente de las causas de sordo-ceguera heredado en seres humanos, siendo así aproximadamente 50% de todos los casos y afectando a un niño de cada 25,000. Hoy en día, no hay terapia específica o curativa para pacientes con USH, excepto el uso de audífonos y implantes de cóclea diseñados para corregir este trastorno. Entre los 3 subtipos clínicos identificados de USH definidos por el grado de discapacidad de audición, la presencia / ausencia de disfunción vestibular y la edad de comienzo de Retinosis Pigmentaria (RP), el tipo USH1 es el más severo. En la última década, varias estrategias para prevenir y tratar RP han sido desarrolladas, incluyendo implantes de retina, agentes farmacológicos, células madres, trasplante de células de la retina, y terapia genética. Ensayos clínicos para algunas de estas estrategias están en curso.

En el año 2012, la primera terapia genética para USH1B "UshStat®" (desarrollado por Oxford BioMedica usando su plataforma LentiVector®) pasó al estudio en humanos. Tres niveles de dosis para la seguridad, tolerancia y aspectos de la actividad biológica de UshStat® están bajo evaluación en la "Oregon Health & Science University" instituto "Casey Eye Institute" donde comenzó el estudio, y en el "Centre Hospitalier Nationale

d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts" de Paris donde el estudio debería comenzar en breve con el apoyo de la fundación "Fighting Blindness". Este estudio de seguridad preparará para ensayos futuros de eficacia. Tratamientos y avances futuros van a requerir más esfuerzo científico como:

- 1) identificar todos los genes causativos y determinar su función,
- 2) desarrollar modelos adecuados en animales,
- 3) descubrir los mecanismos que provoquen el defecto de la retina en USH, y 4) fabricar virus apropiados para transferir material genético a las células apropiadas.

2) Terapia genética para Coroideremia.

Drs. M. Groppe and R.E. MacLaren

University of Oxford & Moorfields Eye Hospital, UK

Hemos empezado un nuevo ensayo clínico utilizando la terapia genética con un vector viral adeno-asociado (AAV) con codificación "Rab escort protein-1" (REP) para tratar a pacientes que sufran coroideremia (NCT01461213). Un vector AAV2 con codificación humano REP1 conducido por un promotor CBA con un virus hepatitis de marmota pos-transferencia elemento regulador (WPRE) fue utilizado. Los primeros 6 pacientes llevan 6 meses de seguimiento, y un paper detallando los efectos de la terapia genética está en evaluación por científicos. Los resultados formales del estudio por tanto se notificarán pronto. Mientras tanto, podemos compartir las siguientes observaciones:

A través de pruebas con microperímetro, hemos observado un defecto funcional de base en esta patología, parecido al Amaurosis congénita de Leber (LCA), pero de forma más sutil. De hecho, la observación se ha hecho con anterioridad por Dr. Sam Jacobson utilizando pruebas psicofísicas en pacientes con coroideremia. La observación es emocionante, porque implica que podremos ver mejora en la sensibilidad de la retina (y, más adelante, en agudeza visual) como evidencia de una transferencia genética con éxito.

No se han observado problemas en separar la fovea en los 6 pacientes, y al menos algún efecto negativo en la visión de los pacientes se compensa con la expresión genética relacionada con el vector. Un adelgazamiento de la retina fue visto en sólo 1 de los 6 pacientes, pero en un área no visual, y estiramiento del área fue notado en proceso operatoria. Creemos que problemas de adelgazamiento de la fovea en estudios de LCA se puede deber más a que los pacientes tuvieran un base de la fovea escaso, y la inyección demasiado cerca de la fovea y/o demasiado rápido, por tanto causando un estiramiento horizontal excesiva de la retina neuro-sensorial. La técnica desarrollada sería apropiada para todo otro tipo de distrofías de conos-bastones en las que las partes periféricas de la retina es más escasa (delgada) que la mácula central.

Hemos construido el estudio de forma multi-centro, para que expertos de otros centros de Reino Unido puedan hacer un seguimiento de los pacientes después de 6 meses. Este espíritu cooperativa es ideal para que otros expertos tengan la posibilidad de examinar a nuestros pacientes y por tanto realizar una verificación independiente de nuestros resultados iniciales. Por otra parte, además hemos compartido nuestros datos con otros centros a nivel mundial para ayudarles a preparar solicitudes regulatorias.

3) Progresos de degeneración fotoreceptor no disminuido después de la terapia genética.

Dr. Artur Cideciyan

Dept. of Ophthalmology, Scheie Eye Institute, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA.

Amaurosis congénito Leber (LCA) se refiere a una forma de retinopatía heredada con comienzo precoz, y una pérdida severa de visión. El ensayo clínico de terapia genética de aumentación para LCA causado por mutaciones RPE65 ha estado en curso en la "University of Pennsylvania" y "University of Florida" desde 2007. Informes anteriores de nuestro grupo, y de otros grupos llevando a cabo otros ensayos clínicos parecidos en paralelo, demostraron que un procedimiento único quirúrgico introduciendo la versión normal de gen RPE65 llega a una mejora de la visión en pocos días o semanas. Sin embargo, RPE65-LCA es una ceguera compleja debido a dos patologías: la

pérdida progresiva de fotorreceptores a la degeneración, y la malfunción de los fotorreceptores restantes. La hipótesis desde el principio fue que el corregir la malfunción retardaría o pararía la degeneración de los fotorreceptores.

Para evaluar esta suposición natural, sacamos una imagen de la retina en pacientes y medimos la sub-capa dentro de la retina donde los núcleos de los fotorreceptores residen. Esta sub-capa lentamente adelgaza con el paso de muchos años, y la velocidad de este adelgazamiento debería reflejar y estar igual a la degeneración de los fotorreceptores. En ojos sin tratar, la capa de fotorreceptores y sus medidas fueron anormalmente escasas incluso en los pacientes más jóvenes con edades de tan sólo 3 años, y progresivamente fueron adelgazando más con un seguimiento periódico durante 5 años más. El ratio de dicho adelgazamiento fue de un 10% anual. Comparamos los ratios de la degeneración de los fotorreceptores en las regiones tratadas a las regiones aún sin tratar y no hubo diferencia. Las regiones tratadas siguieron el ratio esperado de degeneración, incluso paradójicamente reteniendo la mejora en la visión que se alcanzó inmediatamente después de la terapia genética.

El hipótesis es que, una vez iniciado, la degeneración de la retina avanza a pesar de una terapia de aumentación genética con éxito. Hemos probado este hipótesis en el modelo canino de la patología humana. Pero primero, tuvimos que saber la historia natural de la degeneración en perros. El examinar los ojos de una cantidad considerable de perros con las mismas herramientas no-invasivas de imagen utilizadas en humanos demostró que las retinas de los perros no tienen degeneración durante los primeros 5 años de vida (equivalente ~35 años humanos). Por tanto, RPE65 es de comienzo tardía en el perro comparado con el humano. Cuando los perros reciben tratamiento en edades después del comienzo de la degeneración, la terapia genética tuvo como resultado una mejora en la función visual pero no tuvo un efecto alentizador en la degeneración de la retina - igual que en los pacientes humanos.

De momento no sabemos porque las células fotorreceptoras tienen una degeneración en la enfermedad RPE65, pero nuestros resultados son por lo general consistentes con la siguiente explicación hipotética para la paradoja que se ha observado. La función visual tiene su origen en una minoría de

células que son potentes en su función, mientras una degeneración se domina por la pérdida de células que son débiles o nulas en dicha función. Para poder mejorar los resultados de la terapia genética, debemos empezar a utilizar las etapas de los modelos de animales que de verdad representan la condición humana. Debemos suponer menos y verificar más. Debemos entender mejor los caminos de la pérdida de células, y encontrar formas de aumentar la aumentación genética induciendo caminos protectores de células, o inhibiendo los mecanismos de muerte celular.

4) Unoprostone gotas oculares en RP: Ensayo de fase 3 en Japón.

Dr. Shuichi Yamamoto

Dept. of Ophthalmology, Chiba University School of Medicine, Chiba, Japan

UF-021, isopropyl unoprostone, es una gota que ya está aprobada para tratar ojos con glaucoma o hipertensión ocular en EEUU y Japón. Estudios previos demostraron que IU tópico incrementa el flujo sanguíneo coroidal en humanos, y una inyección intra-vitreal de IU protege los fotorreceptores de daños de la luz en ratas. Además, fue demostrado que el apoptosis de fotoreceptores cultivados fue inhibido de manera exitosa con "unoprostone" pero no por "prostaglandin".

Un ensayo clínico de fase 2 en Japón se ha completado en el cual 103 pacientes japoneses con RP fueron puestos en 3 grupos de forma aleatoria: dosis alto, dosis bajo, y placebo. Completaron 6 meses de seguimiento. El punto final primario fue la sensibilidad central de la retina medido por microperímetro. Puntos finales secundarios fueron: agudeza visual, sensibilidad al contraste, HFA sensibilidad de la retina, y QOL relacionado a la visión en cuanto a VFQ25. En una comparativa de la base dentro de los grupos, hubo un incremento estadístico significativo en la sensibilidad central de la retina en pacientes del grupo de alto dosis. En un análisis ajustado para diferencias de base, una mejora dependiente de la dosis en la sensibilidad central fue demostrado. También, hubo diferencias estadísticas significativas entre los grupos de placebo y alto dosis en cambio de la base de la sensibilidad central de la retina y la proporción de pacientes que reflejaron un empeoramiento de la sensibilidad retinal por $\geq 4\text{dB}$ (placebo 21.2%, alto dosis 2.6%). Por otra parte, hubo un cambio estadístico significativo de la

base en el grupo de alto dosis en la media de la sensibilidad central de la retina por HFA. Un análisis sub-grupo demostró que, entre sujetos cuyo sensibilidad central de la retina $<29.4\text{dB}$, hubo una diferencia notable y significativa en el grupo de alto dosis. En una actividad comparativa entre grupos de cambios de la base en los valores totales de puntos VFQ-25 de pacientes, los cambios dentro del grupo de alto dosis fueron estadísticamente significantes. En resumen, esta fase 2 del ensayo clínico demuestra que UF-021 mejora o mantiene la sensibilidad central de la retina en pacientes con RP.

Recientemente, un ensayo clínico de fase 3 ha comenzado en Japón en el cual 300 pacientes con RP se agruparán de forma aleatoria: alto dosis y placebo. El punto final primario de fase 3 es la sensibilidad central medido por HFA. Cada paciente se seguirá por 52 semanas. Después de este periodo, entrarán en un estudio de etiqueta abierta para otras 52 semanas.

5) Transplante de fotorreceptor en degeneración de la retina.

Dr. Robin Ali

UCL Institute of Ophthalmology and Moorfields Eye Hospital, London, England, UK

Una de las causas más comunes de la ceguera irreversible es la pérdida de células fotorreceptoras. Una estrategia nueva terapéutica para tratar a estas patologías, que incluyen AMD, retinopatía diabética y retinopatías heredadas, es el transplante de células fotorreceptoras.

Hacia varias años demostramos que es posible transplantar células fotorreceptoras en la retina de un ratón adulto, con la condición de que las células están en cierta etapa de desarrollo - a post-mitotic photoreceptor precursor (MacLaren et al., Nature in 2006). A pesar de que sólo conseguimos obtener alrededor de 1000 células integradas, eso demuestra una prueba importante del concepto y forma la base de nuestro programa porque este conocimiento se podría usar para generar células adecuadas para transplantar células madre.

Después de 5 años de optimización, conseguimos incrementar la eficacia del transplante, y con alrededor de 30-40,000 células integradas pudimos

demostrar la restauración de la visión en un modelo ratón de la ceguera nocturna estacionario (Pearson et al, Nature 2012). Es otra importante prueba de concepto porque demuestra que las células transplantadas fotorreceptores realizan conexiones funcionales y que haya plasticidad suficiente para realmente mejorar la visión. Recientemente, hemos demostrado que podemos transplantar precursores fotorreceptores en una variedad de modelos animales de degeneración de la retina, incluyendo en modelos de degeneración severa y aún así mejorar la visión (Barber et al, PNAS 2013).

Hasta ahora nos hemos centrado en estudios que conlleven el transplante de precursores fotorreceptores obtenidos de retinas postnatales recientes a ratones adultos con problemas de visión. Con el fin de convertir eso en un tratamiento útil, necesitamos utilizar una fuente renovable de células para el transplante. Células madres embrionarias (ESC) representan la fuente más prometedora de células para transplante, y un progreso considerable se ha visto en la diferenciación en el laboratorio hacia los linajes fotorreceptores. Durante algunos años hemos intentado diferenciar las ES de ratones a precursores fotorreceptores de manera eficaz para poder transplantarlas con éxito. Hasta muy recientemente no hemos tenido éxito. Sin embargo, ahora que hemos utilizado un protocolo nuevo de diferenciación basado en un paper punto de referencia en "Nature" en 2011, escrito por Yoshiki Sasai. El demostró que fue posible generar retinas sintéticas de ESC de ratones.

Ahora hemos optimizado este protocolo y demostrado por primera vez que, después del transplante, los precursores de bastones de retinas derivadas de ESC se integran y maduran con la retina adulta degenerada. Es un estudio importante porque demuestra de forma conclusiva que las ESC pueden proporcionar una fuente útil de fotorreceptores para el transplante de células de retina.

Ahora que hemos demostrado que es posible transplantar fotorreceptores derivados de ESC en ratones, el próximo paso hacia el transplante clínico es desarrollar linajes humanos de ESC para proporcionar una fuente potencialmente ilimitada de precursores fotorreceptores competentes para transplante. En la actualidad, estamos empezando a trabajar con células hE5 y nuestra intención es desarrollar procesos compatibles con GMP que podrán llevar a ensayos clínicos.

6) El uso de las células gliales Muller para la reparación de la retina.

Dr. Tom Reh

Dept. de Estructura Biológica, University of Washington, Seattle, WA, USA.

El estudio de los intentos de Medicina Regenerativa trata de encontrar formas de sustituir las células del cuerpo que han degenerado tales como las células fotorreceptoras en las enfermedades degenerativas de retina como Retinosis Pigmentaria y la Degeneración Macular Asociada a la Edad. El uso de células madre es uno de esos métodos que coge una célula no diferenciada (normalmente embrionaria) y la convierte en una célula madura y funcional como puede ser una neurona fotorreceptora que podría encontrarse en la retina adulta.

Otros métodos en cambio pueden ser usados para generar nuevos fotorreceptores, uno de los cuales utiliza células gliales que son elementos naturales de soporte en la retina. A lo largo de los últimos 10 años, el Dr. Reh y sus colaboradores han proporcionado evidencia de que las retinas de especies más altas (higherspecies) tales como el pollo tenían el potencial de generar nuevas neuronas. En respuesta a un agudo ataque que dañaba extensivamente los fotorreceptores, él descubrió que muchas de las células MULLER volvían a entrar en el ciclo de la célula y comenzaban a expresar marcadores bioquímicos asociados a las células progenitoras retinianas embrionarias. Se sigue llevando a cabo el trabajo in vitro para analizar exhaustivamente los múltiples factores involucrados en la reprogramación de los elementos gliales en neuronas. La diferenciación de las células progenitoras derivadas de gliales ofrece diversas ventajas sobre formas más tradicionales de trasplante e implantación de células madre. Por ejemplo, las células ya están en su lugar sin necesidad de implantar quirúrgicamente nuevas células. Además, existe la posibilidad de disminuir o eliminar los problemas inmunológicos dañinos provocados por la implantación de células extrañas en la retina.

En especies más bajas (lowerspecies) tales como peces y anfibios, existe una conocida habilidad de regeneración de las neuronas retinianas después de un trauma o degeneración inducidos por otros motivos. La comprensión de los

caminos moleculares y bioquímicos de la regeneración podrían llevar a la capacidad de reprogramar células gliales nativas en neuronas retinianas tales como las células fotorreceptoras en los humanos.

7) La liberación intraocular del factor neurotrófico ciliar (CNTF) a través de los Implantes de Tecnología de Células Encapsuladas restaura la función de los conos y la visión diurna en perros con acromatopsia por CNGB3-A.

Andras M. Komaromy,^{1,2} Kristin Koehl,² Christine Harman,² Pam Heatherton,³ Konrad Kauper,³ Gustavo D. Aguirre,¹ Weng Tao³ (1) School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA (2) College of Veterinary Medicine, Michigan State University, East Lansing, MI (3) Neurotech Pharmaceuticals, Inc., Cumberland, RI

Ya demostramos anteriormente que la inyección "bolus" intravítrea de CNTF en perros con acromatopsia CNGB3-A dio lugar (1) a una restauración transitoria de la función de los conos y de la visión diurna, y (2) a una repuesta funcional de conos optimizada a largo plazo a la terapia de aumento de genes a través de AAV. El objetivo de este estudio era el determinar si la liberación intravítrea prolongada de CNTF a través de la tecnología de células encapsuladas (ECT) podía revertir el fenotipo de la enfermedad en la acromatopsia CNGB3 en perros a largo plazo.

Los perros homocigotos para la mutación D262N en CNGB3 fueron implantados unilateralmente con implantes de células encapsuladas secretoras de CNTF. El grado de secreción de CNTF en el pre-implante es de 15 ng / día. Los animales tenían 3 meses (n=2) y 27 meses (n=1) de edad y eran ciegos de día sin respuesta de conos en ERG antes de la operación. Después de la implantación, los perros fueron analizados semanalmente con electroretinografía estándar de campo completo realizada con anestesia general y testeo del comportamiento visual en un circuito de evitación de obstáculos.

En los ojos operados, la visión de día y la función de conos se restauraron parcialmente después de 1 semana de realizado el implante de CNTF. Las amplitudes de las respuestas individuales y de parpadeo de conos al ERG fueron pequeñas (~5-10% de lo normal) pero se mantuvieron al menos

durante 5 semanas o incluso más. Las respuestas escotópicas al ERG se redujeron en 2 de los 3 ojos implantados a <30% de las amplitudes recogidas en los ojos compañeros no operados. Estos datos del ERG eran comparables con nuestras observaciones seguidas de una única inyección "bolus" intravítrea de 12 µg CNTF.

En conclusión, la liberación prolongada intravítrea de CNTF por ECT rescata la función de los conos y la visión diurna en la acromatopsia por CNGB3. Queda por demostrar si este efecto terapéutico puede prolongarse a largo plazo y si el ECT puede ser combinado con aumento de genes dirigidos a los conos a través de AAV para optimizar el tratamiento.

Degeneración macular

8) La tecnología de las células encapsuladas usa un pequeño implante intraocular para liberar en la retina un factor neurotrófico, CNTF.

Dr. Alan Bird

Inherited Eye Disease, Moorfields Eye Hospital, London, England, UK

Hasta la fecha, se han completado diversos estudios clínicos, incluyendo un estudio en fase 1 de RP, 2 estudios en fase 2 de RP (en estadios tempranos y avanzados de la enfermedad) y un estudio en fase 2 con GA. Se demostró a través de AOSLO la preservación de los fotorreceptores conos en el estudio de RP.

Se ha completado recientemente 1 estudio en fase 1 en MacTel y éste mostró que tanto el implante NT-501 como el procedimiento quirúrgico se toleraron bien. Estamos planeando activamente un estudio multi-céntrico en fase 2 para MacTel en USA y Australia.

- El objetivo primordial del estudio en fase 2 será el "cambio en el área de pérdida de IS/OS después de 2 años del implante medido por imágenes enfrente (en face) por SDOCT en estudio(s) de ojos".
- El estudio incluirá 68 sujetos.
- La duración del estudio será de 2 años.

Esperamos iniciar el estudio en el segundo semestre del 2013. Desde una perspectiva regulatoria, hemos logrado los siguientes objetivos:

- Obtenido el estatus de posición idónea para RP y GA con la FDA.
- Obtenido la designación de huérfano para MacTel y RP tanto con la FDA como con la EMA.
- Recibido el acuerdo de la FDA y la EMA con respecto al objetivo primordial para el estudio en fase 2 de MacTel.
- Seguimiento activo de acuerdo/consejo de la FDA y la EMA con respecto al uso de la preservación de conos por AOSLO como objetivo primordial para los estudios en fase 3 de RP.

9) Terapia de células madre para DMAE y Enfermedad de Stargardt.

Dr. Steven Schwartz

Dept. of Ophthalmology, Jules Stein Eye Institute, UCLA School of Medicine, Los Angeles, CA, USA

Nota: Los nuevos resultados indicados abajo están tomados de una reciente publicación en prensa (16.05.2013) por AdvancedCellTechnology.

Las células madre humanas tienen 2 importantes características. Primero, su número se puede expandir en un cultivo de células hasta casi cantidades ilimitadas. Por otro lado, las células tienen el potencial de desarrollarse en cualquier tipo de células del cuerpo, por ejemplo, fotorreceptores de retina o células del epitelio pigmentario retiniano (RPE). Así, la implantación de células madre es atractiva como una posible terapia para sustituir células muertas o defectuosas en casos de degeneración retiniana.

En enfermedades maculares tales como la Enfermedad de Stargardt y la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE), los primeros problemas en la función celular del epitelio pigmentario pueden dar lugar a la muerte en las células fotorreceptoras. Así, la sustitución o la muerte de células defectuosas RPE por implantación de células madre es atractiva como posible terapia de sustitución de células muertas o defectuosas en casos de degeneración retiniana.

En enfermedades maculares tales como la Enfermedad de Stargardt y la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE), los primeros problemas en la función celular del epitelio pigmentario pueden dar lugar a la muerte en las células fotorreceptoras. Así, la sustitución o la muerte de células defectuosas RPE por implantación de células madre podría prolongar la vida de las células fotorreceptoras e incluso restituir su función.

La compañía AdvancedCellTechnology (ACT) está llevando a cabo ensayos clínicos en pacientes con la Enfermedad de Stargardt y DMAE y ya ha publicado resultados preliminares indicando la seguridad y tolerabilidad de su implante de células madre. Es este artículo (Lancet 379:713, 2012), las células RPE derivadas de hESC mostraron "ningún signo de hiperproliferación, tumoración, formación de tejido ectópico o rechazo aparente después de 4 meses." En su más reciente publicación en prensa, ACT reporta que la visión de uno de sus pacientes "mejoró de 20/400 a 20/40 después del tratamiento." A pesar de que ACT añade la renuncia de responsabilidad de que "la mejoría reportada en la visión de los pacientes en la nota de prensa puede no ser indicativa del futuros resultados...", los resultados positivos son bienvenidos y permiten la esperanza para mejoría en otros pacientes usando esta forma de Medicina Regenerativa.

10) Liberación génica de ADN por medio de nanopartículas en la Enfermedad de Stargardt.

Dr. Muna Naash

Dept. of Ophthalmology, University of Oklahoma, Oklahoma City OK, USA

El ojo es un órgano adecuado para el desarrollo y ensayo de nuevas aproximaciones terapéuticas. Es fácilmente accesible y permite la aplicación local de agentes terapéuticos con riesgo reducido de efectos sistémicos. Existe necesidad de desarrollar aproximaciones terapéuticas no virales para enfermedades oculares. Nuestro y otros laboratorios han investigado el potencial de la nanotecnología para la liberación ocular de genes terapéuticos. Así las investigaciones han remarcado el gran potencial de éxito de las nanopartículas des ser aproximaciones exitosas para la liberación ocular de genes.

Nuestro grupo se ha centrado en la eficacia de las nanopartículas de ADN compactado para el tratamiento de diferentes enfermedades, particularmente las asociadas con la retina y el epitelio pigmentario retiniano. Hemos mostrado que el tratamiento de nanopartículas lleva a la transfección eficiente de células oculares, expresión del gen a largo plazo, y no ejerce efectos tóxicos en el ojo incluso después de múltiples inyecciones. Estas nanopartículas median un significativo rescate funcional en modelos animales de Retinosis Pigmentaria, Distrofia Macular de Stargardt y Amaurosis Congénita de Leber. No tienen limitaciones en el tamaño genético a transportar y se ha mostrado la expresión efectiva del gen con vectores de hasta 20 kb en el pulmón y de 14 kb en el ojo, haciéndolos un complemento idóneo para los AAV especialmente para la liberación de genes grandes. Es más, en un estudio de comparación de uno por uno con AAV, recientemente reportamos que las nanopartículas pueden acarrear la expresión del gen en una escala comparable de longevidad con el AAV.

11) Antioxidantes multifunción para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas y asociadas a la edad.

Dr. Peter F. Kador

Departamento de Ciencias Farmacéuticas y Departamento de Oftalmología de University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, TherapeuticVision, Inc. Omaha, NE, USA

Hemos sintetizado dos series de antioxidantes activos multifunción orales (MFAOs) que tienen diferente actividad de búsqueda de radicales libres y actividad de atenuación de metal independiente. Las 2 series muestran actividad quelante de metal selectiva frente al hierro, al cobre y al zinc, así como actividad antioxidante similar frente a los radicales de *hidroxyl*, peróxido y superóxido valorada en epitelio pigmentario retiniano (ARPE-19) en humanos, neuroblastoma humano (SH-SY5Y), y células epiteliales de lente humana SRA. La administración oral en ratones indica que las primeras series MFAO retrasan los cambios de lente inducidos por la diabetes, la radiación gamma y la radiación UV y protege la capa de fotorreceptores frente al daño por luz. En contraste con las primeras series, la administración oral de las segundas series de MFAOs a ratones resulta en la acumulación en el cerebro

y la retina, pero no en la lente. Las dos series de MFAOs muestran falta de toxicidad al ser administradas a través de gavage en dosis de 1600 mg/kg.

Teniendo en cuenta que la disfunción mitocondrial y la neurotoxicidad de *beta amyloid* ($A\beta$) están asociadas con cambios retinianos por la edad, el efecto de MFAOs en estos factores ha sido también investigado en neuroblastoma humano y células del epitelio pigmentario retiniano. A pesar de que estos contienen quelato de hierro, no afectan negativamente a la función mitocondrial. De hecho, realmente protegen la mitocondria del envenenamiento por manganeso. Ambas series MFAO combinan también con el zinc; pero el tinte por zinquina indica que estos compuestos no reducen adversamente los niveles de zinc del citoplasma. Sin embargo, las dos series MFAO eliminan inmediatamente el zinc del complejo de zinc *beta amyloid* neurotóxico que no es degradado de inmediato por la *metaloproteinase matriz* (MMP)-2. La eliminación del zinc del complejo de zinc *betaamyloid* neurotóxico por MFAOs permite que MMPS degrade *betaamyloid*. La interacción de MFAOs con zinc es similar a la actividad de "atenuación de metal" mostrada por *clioquinol* y reportada por PBTS, un análogo del *clioquinol* actualmente en ensayo clínico en fase 2 para el tratamiento de la demencia de Alzheimer.

12) Resultados del Ensayo Clínico AREDS2.

Dr. Emily Chew

Epidemiology & Clinical Applications, National Eye Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA.

El estudio 2 de la Enfermedad de Degeneración Macular Asociada a la Edad (AREDS2), un ensayo clínico multi-céntrico randomizado examinó la adición de luteína (10mg)/zeaxantina (2mg) y/o ácidos grasos omega 3 a la formulación original de AREDS. Los investigadores no encontraron ni efectos negativos ni positivos de los ácidos grasos omega 3 para el tratamiento de la Degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE). Los análisis de los efectos principales indicaron que la luteína/zeaxantina tenían efectos beneficiosos al reducir el riesgo de DMAE avanzado en un 10%, por reducir el riesgo de DMAE avanzado en un 26% en personas con baja ingesta por dieta de luteína/zeaxantina, y por reducir el riesgo de la progresión a DMAE

neovascular en un 22% en las comparaciones uno a uno de luteína/zeaxantina vs. beta-carotenos.

Se comprobó la seguridad de la formulación AREDS con la eliminación de los beta-carotenos. El hallazgo del aumento del cáncer de pulmón en las personas suplementadas con beta-carotenos y la mayoría de los exfumadores mostró datos convincentes para eliminar los beta-carotenos. Es más, se observó un efecto de eficacia amplificada en aquellos tratados con luteína/zeaxantina comparados con los de beta-carotenos como se ha indicado arriba.

Una formulación más segura y eficaz, que puede ser definida como la formulación AREDS2 eliminaría los beta-carotenos, añadiendo luteína (10mg) y zeaxantina (2 mg), manteniendo la vitamina C (500 mg), la vitamina E (400 unidades internacionales), el zinc (80 mg) y el cobre (2 mg).

Terapias generales y Progreso de la Investigación en Distrofias de Retina

13) Prótesis retinianas: puesta al día.

Dr. Eberhart Zrenner

Dept. Of Ophthalmology, University of Tuebingen, Tuebingen, Germany.

Existen varios grupos trabajando en todo el mundo en aspectos de las prótesis de retina electrónicas, sobre todo en el trabajo preclínico en Asia, Australia, EEUU y Europa (ver los análisis recientes de Weiland JD, et al (2011) Oftalmología. 118: 2227-37 y Guenther et al. (2012) Expert Rev. Med. Devices 9: 33-48).

Hoy en día existen 2 tipos de prótesis retinianas disponibles para pacientes:

- a) Implante epirretiniano: El sistema ARGUSII fabricado por SecondSight Medical Products, Sylmar, California con 60 electrodos epirretinianos, gafas con cámara y un sistema de transmisión electrónico a la parte posterior del ojo. Después de haber concluido un estudio en 30 pacientes, el sistema ha recibido recientemente la marca CE y la aprobación de la FDA. Entretanto otros 20 pacientes han sido

implantados. El máximo de agudeza visual observado hasta ahora fue de 20/1200 con una mejora en la movilidad en la mayoría de los pacientes. A día de hoy está planificado un estudio de post-marketing y el coste del aparato es de 150.000 \$ americanos por unidad.

Parece ser que la cámara tiene como ventaja la posibilidad de hacer un zoom y como desventaja que la imagen se pierde más fácilmente y solo puede ser restaurada con un cabeceo. Para mayor información ver Humayun et al. (2012) *Ophthalmology* 119:779-88.

- b) Implante subretiniano: El Alpha IMS es producido por Retina Implant AG, Tübingen/Reutlingen, Alemania. Después de un estudio piloto en 11 pacientes (2005-2009), actualmente se está llevando a cabo un ensayo principal con 25 pacientes más en diversos centros (Oxford, Londres, Tübingen, Dresden, Hong Kong entre otros).

El sistema consiste en un chip sensible a la luz, similar a un chip de una cámara que se implanta en el espacio subretiniano en la parte trasera del ojo en el lugar de los fotorreceptores degenerados. Cada chip está formado por 1500 fotodiodos sensibles a la luz, amplificadores y electrodos. La imagen se resuelve punto por punto y, dependiendo del brillo de cada punto, se envía una corriente a la capa de células bipolar. No existe cámara exterior porque toda la electrónica está dentro del ojo y se mueve con el mismo, excepto la bobina alimentadora de corriente que se implanta debajo de la piel en la parte posterior del oído. La mejor agudeza visual descrita es de 20/546. Debido a las *microsaccades*, no suele perderse la imagen y algunos de los pacientes han sido capaces del reconocimiento facial. Para más detalles ver Stingl et al. (rspb.royalsocietypublishing.org/content/280/1757/20130077.full.pdf+html). El estudio sigue en marcha y el tiempo de observación restante es de 1.5 años.

- c) Otros desarrollos: En Australia, 3 pacientes han sido implantados con BionicVision, un arraysupracoroidal de límite de cable de 24 electrodos; todavía no existe un implante completo disponible.

Otro nuevo desarrollo incluye el trabajo preclínico con elementos pasivos por Palanker et al. Universidad de Stanford, EEUU (Mathieson et al. (2012) Nature Photonics 6, 391-7). Para conseguir tener 3 elementos fotosensibles por pixel en una línea, se puede producir voltaje suficiente que estimule las neuronas retinianas. Sin embargo, esto necesita de una cantidad enorme de luz que solo puede ser producida por gafas dirigidas por un láser especial.

Una compañía de París recién fundada (PIXIUM VISION) ha unido fuerzas con la antigua compañía germano suiza IMI y el grupo Palanker para explorar nuevas posibilidades de uso de elementos pasivos.

Para una mayor comparación de las diferentes aproximaciones ver Zrenner (2012), Nature Photonics 6: 344–5.

14) Restauración de la función visual en ratones ciegos con fotointerruptores químicos Red-Shifted.

Drs. Ivan Tochitsky¹; A. Polosukhina¹; A. Friedman²; A. Noblet¹; D. Trauner³; D. Kaufer² and R. Kramer¹

Departamento de Biología Celular y Molecular y 2. Departamento de Biología Integrativa, Universidad de California, Berkeley, EEUU 3. Departamento de Química, Universidad Ludwig-Maximilians Universität, Munich, Alemania.

Las enfermedades degenerativas que causan ceguera tales como la Retinosis Pigmentaria y la Degeneración Macular Asociada a la Edad afectan a millones de pacientes en todo el mundo. Estos desórdenes causan la pérdida progresiva de los fotorreceptores conos y bastones en la retina, conduciendo paulatinamente a la completa ceguera. Se están explorando diferentes aproximaciones para restaurar la visión en pacientes ciegos. Nuestro objetivo es desarrollar y testear nuevas terapias farmacológicas para la restauración de la visión. En este caso, mostramos la restauración de función visual en ratones ciegos tras recibir una inyección de un compuesto de "fotointerruptores" químicos *red-shifted*. Hemos creado diversos pequeños fotointerruptores moleculares que pueden ser usados para controlar la actividad de las neuronas bloqueando canales de iones nativos

reversiblemente en respuesta a la luz. Para evaluar la capacidad de estos fotointerruptores de restaurar la sensibilidad a la luz en ratones ciegos, los hemos probado en un modelo de ratón rd1 con Retinosis Pigmentaria. Nuestras mediciones *in vitro* de la respuesta retiniana a la luz se llevaron a cabo usando un array de multi-electrodos (MEA). También probamos *in vivo* la restauración de diferentes comportamientos guiados visualmente en ratones ciegos.

Previamente hemos mostrado *in vitro* que el fotointerruptor AAQ podía causar respuestas a la luz en retinas anteriormente ciegas así como restaurar el reflejo pupilar a la luz y comportamientos de adversidad a la luz en ratones ciegos. En esta ocasión, presentamos la restauración de la sensibilidad visual en ratones ciegos *in vitro* e *in vivo* con 2 moléculas de fotointerruptores *red-shifted*, DENAQ y BENAQ. A diferencia de AAQ, DENAQ y BENAQ no necesitan el uso de luz ultravioleta y vuelve una retina ciega sensible a la luz visible (azul-verde) en una intensidad de luz equivalente a la luz ordinaria de día. Estas moléculas *red-shifted* fotosensibilizan las retinas *in vitro* de los ratones ciegos rd1. Los fotointerruptores duran hasta varias semanas *in vivo* y son bien tolerados por el ojo. DENAQ y BENAQ son selectivos de tejido degenerado frente al tejido retiniano sano, lo cual sugiere que no interferirían con ninguno de los fotorreceptores aún existentes en pacientes con enfermedades retinianas. La inyección intravítrea de DENAQ también restaura la sensibilidad a la luz de los ratones rd1 *in vivo* en un ensayo exploratorio de comportamiento locomotor. Es más, los animales inyectados con DENAQ son capaces de revertir la polaridad de su respuesta inocente a la luz después de apropiados condicionamientos de miedo, indicando que su visión restaurada es suficiente para que pueda dar lugar al aprendizaje visual.

En conclusión, fotointerruptores químicos *red-shifted* tales como DENAQ y BENAQ, y nuestra aproximación farmacológica en general, sostiene una gran promesa de restaurar la función visual en estados últimos de enfermedades degenerativas que conducen a la ceguera.

15) Reactivación optogenética de fotorreceptores no fotosensibles.

Dr. Serge Picaud

Institut de la Vision, INSERM, Paris, France

Nuestro proyecto pretende restaurar la visión en pacientes ciegos como consecuencia de la degeneración de los fotorreceptores como ocurre en la Retinosis Pigmentaria usando proteínas optogenéticas. Es un programa de colaboración sufragado por la fundación FightingBlindness y Gensight, una compañía incipiente creada gracias al soporte de Novartis y los fondos aportados por Novartis Venture. El proyecto se ha llevado a cabo con el Dr. Roska del FMI en Basilea, Suiza y el Pr. Sahel y yo mismo del VisionInstitute en París, Francia. Las prótesis retinianas han mostrado que es posible restaurar algo de visión en pacientes ciegos pero nosotros trabajamos en una estrategia alternativa, la terapia optogenética, que consiste en reactivar células retinianas residuales expresando bombas iónicas o canales después de la degeneración de los fotorreceptores gracias a la terapia génica. Estamos tratando de reactivar los fotorreceptores, que han perdido su sensibilidad a la luz usando la bomba cloruro, *halorhodopsin*.

De hecho, hemos mostrado:

- 1) Que algunos conos PR permanecen en pacientes ciegos afectados de Retinosis Pigmentaria. Estos PR han perdido su parte fotosensible, el segmento externo, lo cual explica el porqué de que los pacientes sean ciegos. PR no fotosensibles inactivos similares pueden hallarse en modelos animales de la enfermedad.
- 2) Y que los PR inactivos en ratones ciegos pueden reactivarse a la luz expresando *halorhodopsin*, a través de la terapia génica. La percepción visual en estos ratones ciegos se indica por respuestas a la luz en PR y células retinianas ganglionares.
- 3) Después de mostrar estos resultados en ratones ciegos, hemos usa retina humana post-mortem en cultivo para mostrar que los PRS de conos humanos pueden expresar *halorhodopsin* funcional a un nivel suficiente para polarizar los PR.

Nuestro objetivo actual es mostrar que este alto nivel de expresión puede ser obtenido *in vivo* en primates no humanos y que no desencadena una respuesta inmune porque *halorhodopsin* es una proteína bacteriana. Hemos probado ya nuestro vector viral AAV y obtenido una expresión alta y selectiva

de la proteína verde fluorescente GFP en los PR de los conos. Cuando co-expresamos *halorhodopsin* GFP, todavía mantenemos una alta expresión de proteína como indica la fluorescencia GFP.

Todavía tenemos que mostrar que este nivel de expresión puede activar el tejido retiniano por si solo y medir los marcadores de respuesta inmune antes de testear la remesa clínica del virus. Esta demostración es bastante compleja de obtener porque estamos usando monos normales. Por lo tanto, sus PR tienen la respuesta natural a la luz y estamos introduciendo una sensibilidad adicional a la luz. Tenemos por tanto que decolorar la respuesta natural a la luz para mostrar una respuesta creada por la optogenética. Para tener más opciones, también podemos cultivar la retina durante un periodo de tiempo para que pierda la respuesta natural y mostrar la respuesta obtenida por *halorhodopsin*.

16) Hacia un registro exhaustivo de las variantes de secuencia de AND asociadas con las enfermedades hereditarias de retina en bases de datos Leiden Open Variation.

Dr. F.P.M. Cremers

Departamento de Genética Humana - Radboud University Medical Centre, Nijmegen, Países Bajos

Las enfermedades hereditarias de retina presentan un grado impresionante de heterogeneidad ya que han sido identificadas casi 10000 mutaciones en más de 190 genes. Las mutaciones en estos genes representan entre el 30% y el 90% de los casos, dependiendo del tipo de enfermedad.

Un genotipado completo de las personas con enfermedades hereditarias de retina mejora el diagnóstico genético y la exactitud del pronóstico de la enfermedad.

Es más, el genotipado identifica personas aptas para terapias novedosas. Estamos entrando en una era de diagnóstico rutinario de defectos asociados a enfermedades de retina, tanto en centros académicos como en los que no lo son. Las variantes conocidas y novedosas identificadas no son publicadas o incluidas en bases de datos de libre acceso. El compartir las variantes secuenciales y sus fenotipos asociados están en el corazón del diagnóstico de

ADN y es por tanto de importancia máxima el registrar esta información en las bases de datos públicamente disponibles.

La estructura y el uso de las bases de datos de mutaciones de distrofias de retina tienen que reunir los siguientes criterios: 1) acceso abierto basado en la web; 2) Registro de todas las variantes secuenciadas publicadas; 3) fácil incorporación de nuevas variantes; 4) evaluación precisa de los datos de mutaciones; 5) actualización regular. Proponemos la implementación de bases de datos *Leiden Open Variation (LOVDs)* para todos los genes de distrofias de retina en los próximos 5 años. LOVDs fueron creados previamente para los 10 genes asociados al síndrome de Usher. Un equipo de estudiantes y miembros de la plantilla en Islamabad, recolectarán todas las variantes secuenciadas publicadas para el resto de genes de distrofias de retina, hacer el escrutinio de todos ellos para las anotaciones correctas, y subirlos a los LOVDs de genes específicos. Comisarios de todo el mundo revisarán las nuevas entradas.

Se crearon LOVDs “vacíos” para todos los genes asociados con distrofias de retina, y se registraron todas las variantes publicadas para AIPL1, LCA5, RDH5, SEMA4A, y TULP1. Anteriormente se habían creado otros almacenes para los genes asociados CEP290, NDP, and Bardet-Biedl. Estos serán trasladados a LOVDs. En 2013, se depositarán en LOVDs variantes de otros 20 genes asociados a las distrofias de retina y los LOVDs existentes serán actualizados anualmente.

El éxito a largo plazo de este trabajo depende de la organización robusta de la actualización de la secuenciación de variantes, de una revisión apropiada, del mantenimiento de las bases de datos, y de una base financiera saneada. Será también vital la introducción de destituciones obligatorias de variantes secuenciales antes de la presentación para publicación, y el cumplimiento de las instalaciones de diagnóstico en todo el mundo para depositar las variantes no publicadas en LOVDs.