

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 828 050**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2016** E 17210269 (1)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2020** EP 3360890

54 Título: **Terapia génica**

30 Prioridad:

28.10.2015 GB 201519086

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

25.05.2021

73 Titular/es:

**SYNCONA IP HOLDCO LIMITED (100.0%)
8 Bloomsbury Street
London WC1B 3SR, GB**

72 Inventor/es:

**GROENDAHL, CHRISTIAN;
FUNNELL, TIM y
HOLLOWOOD, CHRIS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 828 050 T3

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

DESCRIPCIÓN

Terapia génica

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos para su uso en la terapia génica de enfermedades oculares. Más específicamente, la invención se refiere a vectores virales adenoasociados (AAV), para su uso en el tratamiento o prevención de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), en la que los vectores permiten el suministro del Factor I o fragmentos del mismo al ojo.

Antecedentes de la invención

15 La mácula es un área pequeña en la retina del ojo, de aproximadamente 3 a 5 milímetros de tamaño, adyacente al nervio óptico. Es el área más sensible de la retina y contiene la fovea, una región deprimida que permite una alta agudeza visual y contiene una densa concentración de conos, los fotorreceptores responsables de la visión del color.

La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es la causa más común de ceguera funcional en los países desarrollados para las personas mayores de 50 años (Seddon, J M. Epidemiology of age-related macular degeneration. En: Ogden, TE, et al., eds. Ryan SJ, editor en jefe. Retina Vol II. 3a ed. St. Louis, Mo.: Mosby; 2001: 1039-50). La AMD se asocia con una neovascularización que se origina en la vasculatura coroidea y se extiende hacia el espacio subretiniano. Además, la AMD se caracteriza por la degeneración progresiva de la retina, el epitelio pigmentario de la retina (RPE) y la coroides subyacente (el tejido muy vascularizado que se encuentra debajo del RPE, entre la retina y la esclerótica).

25 Una variedad de factores que incluyen estrés oxidativo, inflamación con un posible componente autoinmune, antecedentes genéticos (por ejemplo, mutaciones) y factores ambientales o de comportamiento tales como tabaquismo y la dieta pueden contribuir a la patogénesis de la AMD.

30 La progresión clínica de la AMD se caracteriza por etapas de acuerdo con los cambios en la mácula. El sello distintivo de la AMD temprana son las drusas, que son acumulaciones de desechos extracelulares debajo de la retina y aparecen como manchas amarillas en la retina en el examen clínico y en las fotografías del fondo de ojo. Las drusas se clasifican por tamaño como pequeñas (< 63 µm), medianas (63-124 µm) y grandes (> 124 µm). También se consideran duras o blandas de acuerdo con el aspecto de sus márgenes en el examen oftalmológico. Mientras que las drusas duras tienen márgenes claramente definidas, las blandas tienen márgenes menos definidas y fluidas. La escala de gravedad fotográfica del fondo de ojo del estudio de enfermedades oculares relacionadas con la edad (AREDS) es uno de los principales sistemas de clasificación utilizados para esta afección.

40 La AMD se ha clasificado en formas "secas" y "húmedas" (exudativas o neovasculares). La AMD seca es más común que la AMD húmeda, pero la forma seca puede progresar a la forma húmeda y las dos ocurren simultáneamente en un número significativo de casos. La AMD seca se caracteriza típicamente por la apoptosis progresiva de las células en la capa del RPE, las células fotorreceptoras superpuestas y, con frecuencia, también las células subyacentes de la capa capilar coroidea. Las áreas confluentes de muerte celular del RPE acompañadas de atrofia de los fotorreceptores suprayacentes se denominan atrofia geográfica. Los pacientes con esta forma de AMD experimentan un deterioro lento y progresivo de la visión central.

50 La AMD húmeda se caracteriza por sangrado y/o fuga de líquido de vasos anormales que han crecido desde los vasos coroideos (coriocapilares) debajo del RPE y la mácula, que puede ser responsable de la pérdida repentina e incapacitante de la visión. Se ha estimado que gran parte de la pérdida de visión que experimentan los pacientes se debe a dicha neovascularización coroidea (CNV) y sus complicaciones secundarias. Un subtipo de AMD neovascular se denomina proliferación angiomasosa retiniana (RAP). En este documento, la proliferación angiomasosa se origina en la retina y se extiende posteriormente hacia el espacio subretiniano, comunicándose finalmente en algunos casos con nuevos vasos coroideos.

55 El sistema del complemento (CS) se ha implicado en la patogénesis de AMD temprana basándose en la identificación de componentes del CS en drusas de ojos de pacientes con AMD. En la AMD, se han identificado al menos 129 tipos de proteínas depositadas en drusas, incluidos diferentes tipos de apolipoproteínas (E, B o AI), varios péptidos amiloides (P, Aβ o SA-1), TIMP-3, albúmina de suero, y ciertas proteínas asociadas con la función celular (por ejemplo, subunidad β de la ATP sintasa, receptor eliminador B2 y retinol deshidrogenasa). Las drusas derivadas de AMD también contienen casi todas las proteínas del complemento, incluidas las proteínas reguladoras (CFH, receptor 1 del complemento (CR1), vitronectina y clusterina), los productos de la activación y de degradación del CS (C1q, C3, C3a, C3b y C5a) y miembros de la ruta del CS terminal que comprenden los componentes MAC (es decir, 5, 6, 8 (α, β y γ) y 9) en forma separada y compleja. La acumulación de drusas puede activar el CS, desencadenar la producción local de mediadores inflamatorios y atraer leucocitos que, a su vez, aumentan el estado inflamatorio local presente en la AMD.

Las opciones de tratamiento actuales para AMD incluyen terapia fotodinámica con benzoporfirina (Arch Ophthalmol. 1999; 117: 1329-1345) y una serie de terapias que se dirigen a la vía del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Ejemplos de tales terapias dirigidas a VEGF incluyen el aptámero pegaptanib (N Engl J Med. 2004; 351: 2805-2816) y anticuerpos tales como ranibizumab (N Engl J Med. 5 de octubre de 2006; 355 (14): 1432-44) y bevacizumab (BMJ. 9 de junio de 2010; 340: c2459). Sin embargo, no todos los pacientes responden al tratamiento con un anticuerpo anti-VEGF y no recuperan la visión o progresan a la ceguera registrada.

Sumario de la invención

Los presentes inventores proporcionan ahora un enfoque para modular el sistema del complemento que es útil, por ejemplo, en el tratamiento de AMD. Los inventores proporcionan EL Factor I administrado por terapia génica con el objetivo de regular negativamente el ciclo de retroalimentación de C3b del complemento a través del direccionamiento del ciclo de degradación (Figura 1). El reequilibrio resultante del circuito de retroalimentación de la vía alternativa promoverá la degradación de C3b e iC3b y, por lo tanto, eliminará los principales factores de enfermedad en los trastornos mediados por el complemento, en particular los trastornos que tienen un defecto subyacente en la regulación de la vía alternativa.

En un aspecto, la invención proporciona un vector viral adenoasociado (AAV) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o un fragmento del mismo, en el que el fragmento es capaz de escindir C3b en iC3b y en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo está unido operativamente a un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE). También se describen en este documento un vector viral adenoasociado (AAV) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el Factor H o un fragmento o derivado del mismo, un vector viral adenoasociado (AAV) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-Factor D, y un vector viral adenoasociado (AAV) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-componente 5 del complemento (C5).

En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1 o 9;
- (b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 2 u 8; y
- (c) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 u 8.

Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o su fragmento codifica una proteína con la actividad natural del Factor I (por ejemplo, la proteína representada por la SEQ ID NO: 1 o 9). Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo puede codificar una proteína con la capacidad de procesar C3b e iC3b en productos de degradación inactivos. Dicho de otra manera, el Factor I o un fragmento del mismo retiene preferiblemente la actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b.

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo codifica una proteína con actividad inactivadora de C3b y de degradación de iC3b.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula aislada transfectada con y que comprende el vector AAV de la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el vector AAV de la invención o la célula aislada de la invención en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, la composición farmacéutica es para administración intraocular.

En una realización, el vector AAV comprende un promotor de beta-actina de pollo (CBA), por ejemplo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo. En una realización, el vector AAV comprende un promotor CAG, por ejemplo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o un fragmento del mismo. En una realización, el vector AAV comprende un promotor con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5, por ejemplo operativamente unido a la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo.

En una realización, el vector AAV comprende un elemento potenciador de citomegalovirus (CMV), por ejemplo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo.

En una realización, el vector AAV comprende una señal poli-A de hormona de crecimiento bovino, por ejemplo unida operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo, preferiblemente una señal poli-A de hormona de crecimiento bovino que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6.

En una realización, el WPRE tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

En una realización preferida, el vector AAV de la invención está en forma de partícula viral.

5 En una realización preferida, la partícula viral del AAV comprende un genoma de AAV2 y proteínas de la cápside de AAV2. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo está operativamente unido a un promotor CAG, preferiblemente un promotor con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.

10 El vector AAV, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención pueden usarse para tratar o prevenir un trastorno ocular.

En una realización, la invención proporciona el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno del ojo mediado por el complemento.

15 En una realización, el trastorno está asociado con la sobreactividad del ciclo de retroalimentación de C3b del complemento y/o la baja actividad del ciclo de degradación de C3b (véase la Figura 1). En una realización, el trastorno es degeneración macular relacionada con la edad (AMD) o retinopatía diabética. En una realización preferida, el trastorno es AMD, preferiblemente AMD seca.

20 En una realización, el uso es para tratar o prevenir un trastorno en un sujeto:

(a) tener una actividad o concentración del Factor I más baja de lo normal en el ojo y/o suero, preferiblemente tener una concentración o actividad equivalente a 0-30 o 0-20 o 0-10 µg/mL en suero; y/o

25 (b) ser heterocigoto u homocigoto para un SNP asociado a la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), preferiblemente una variante rara del Factor I.

En una realización, el uso es para tratar o prevenir un trastorno en un sujeto:

30 (a) que tiene un nivel normal de actividad o concentración del Factor I en el ojo y/o suero, preferiblemente al menos 30 µg/mL, tal como 30-40 µg/mL en suero; y/o

35 (b) que no porta un alelo raro de una variante del Factor I.

En otro aspecto, la invención proporciona el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). La AMD puede ser, por ejemplo, AMD seca. En una realización preferida, la AMD es AMD seca.

40 En otro aspecto, la invención proporciona el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de la retinopatía diabética.

En una realización, se previene o reduce la formación de atrofia geográfica. En otra realización, se reduce la cantidad de atrofia geográfica.

45 En una realización, se ralentiza la progresión de la atrofia geográfica. Preferiblemente, hay al menos un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de reducción en el aumento del área de atrofia geográfica durante los 12 meses posteriores a la administración a un ojo de un sujeto, en relación con un ojo no tratado durante el mismo período.

50 En otro aspecto, la invención proporciona el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para su uso en la mejora o restauración de la visión o la agudeza visual, por ejemplo, en un sujeto que padece un trastorno ocular, tal como un trastorno ocular descrito. En el presente documento. En otro aspecto, la invención proporciona el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para su uso en la mitigación de la pérdida de visión o agudeza visual, por ejemplo, una pérdida de visión o agudeza visual asociada con un trastorno ocular, tal como un trastorno ocular divulgado en este documento.

55 En otro aspecto, la invención proporciona el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para su uso en la mejora o restauración de la velocidad de lectura en un sujeto, por ejemplo, en un sujeto que padece un trastorno ocular, tal como un trastorno ocular divulgado en este documento. En otro aspecto, la invención proporciona el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para su uso en la mitigación de la reducción de la velocidad de lectura en un sujeto, por ejemplo, una reducción de la velocidad de lectura asociada con un trastorno ocular, tal como un trastorno ocular divulgado en el presente documento.

60 En otro aspecto, la invención proporciona el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para su uso en la reducción o prevención de la pérdida de fotorreceptores y/o del epitelio pigmentario de la

retina (RPE), por ejemplo una pérdida de fotorreceptores y/o el RPE asociado con un trastorno ocular, tal como un trastorno ocular divulgado en este documento.

5 En una realización preferida, el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la invención se administra por vía intraocular. Los inventores reconocen que tal administración local de la terapia proporciona un medio prácticamente para alcanzar los niveles requeridos del factor del complemento para tratar o prevenir el trastorno del ojo mediado por el complemento, por ejemplo, AMD.

10 En una realización, el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención se administra al ojo de un sujeto mediante inyección subretiniana, retiniana directa, supracoroidea o intravítrea.

En una realización particularmente preferida, el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención se administra al ojo de un sujeto mediante inyección subretiniana.

15 En una realización, la administración del vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención aumenta así el nivel de actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b en el sujeto, en particular en el ojo, tal como en el RPE, del sujeto. En otra realización, la administración del vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención aumenta así el nivel de actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b en el sujeto, en particular en el ojo, tal como en el RPE, del sujeto a un nivel que excede un nivel normal en el ojo.

20 También se describe en el presente documento un método para tratar o prevenir un trastorno del ojo mediado por el complemento que comprende administrar el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención a un sujeto que lo necesite.

25 En una realización, el trastorno está asociado con la sobreactividad del ciclo de retroalimentación de C3b del complemento y/o la infraactividad del ciclo de degradación de C3b. En una realización, el trastorno es la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) o la retinopatía diabética. En una realización preferida, el trastorno es AMD, preferiblemente AMD seca.

30 También se describe en el presente documento un método para tratar o prevenir la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) que comprende administrar el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención a un sujeto que lo necesite. La AMD puede ser, por ejemplo, AMD seca. En una realización preferida, la AMD es AMD seca.

35 También se describe en el presente documento un método para tratar o prevenir la retinopatía diabética que comprende administrar el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención a un sujeto que lo necesite.

40 El sujeto puede, por ejemplo, haber sido diagnosticado con AMD o estar en riesgo de adquirir AMD.

En una realización preferida, el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica se administra por vía intraocular.

45 En una realización, el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica se administra al ojo de un sujeto mediante inyección subretiniana, retiniana directa, supracoroidea o intravítrea.

En una realización particularmente preferida, el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica se administra al ojo de un sujeto mediante inyección subretiniana.

50 También se describe en el presente documento el uso del vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para fabricar un medicamento para tratar o prevenir un trastorno del ojo mediado por el complemento.

55 En una realización, el trastorno está asociado con la sobreactividad del ciclo de retroalimentación de C3b del complemento y/o la infraactividad del ciclo de degradación de C3b. En una realización, el trastorno es la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) o la retinopatía diabética. En una realización preferida, el trastorno es AMD, preferiblemente AMD seca.

60 También se describe en el presente documento el uso del vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para fabricar un medicamento para tratar o prevenir la degeneración macular relacionada con la edad (AMD). En una realización preferida, AMD es AMD seca.

65 También se describe en el presente documento el uso del vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para fabricar un medicamento para tratar o prevenir la retinopatía diabética.

En una realización, el vector AAV de la invención no comprende un promotor hAAT.

En una realización, el vector AAV de la invención no comprende un potenciador de ApoR.

5 En otra realización, el vector AAV de la invención no comprende dos potenciadores de ApoR.

En una realización, el vector AAV de la invención no comprende un genoma de AAV2 y una proteína de la cápside de AAV8, es decir, el vector AAV de la invención no es un vector AAV2/8.

10 En una realización, el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención no se administra por vía sistémica. En otra realización, el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención no se administra por vía intravenosa.

Descripción de los dibujos

15 **Figura 1**
Ciclos de retroalimentación (amplificación) y degradación (subregulación) de C3b de la vía alternativa del complemento de vertebrados ("I" = Factor I; "H" = Factor H; "B" = Factor B; y "D" = Factor D).

20 **Figura 2**
Un gel de agarosa de digestiones de restricción de CFI y CFico. La banda de 1752 pb de CFI se cortó y se clonó en la cadena principal de pAAV-CBA-WPRE-bGHpA.

25 **Figura 3**
Inmunotransferencia de CFI (Figura 3A) y de GFP (Figura 3B). 3A: CFI aparece como una banda de 70 kDa (no reducida) y se expresó a velocidades iguales después de la transfección de ARPE-19 con pAAV.CFI o pAAV.CFico. No se expresó CFI después de la transfección con pAAV. Se utilizó suero humano normal (NHS) al 10% como control positivo para la inmunotransferencia de CFI. 3B: La eficacia de la transfección se analizó mediante cotransfección de células ARPE-19 con pCMV.GFP. La GFP aparece como una banda de 30 kDa y la inmunotransferencia confirmó que las células se han transfectado con eficiencias similares.

35 **Figura 4**
Inmunotransferencia de CFI en el sobrenadante de líneas celulares HEK-293 y ARPE-19 transducidas por virus. 4A: Se cargó el sobrenadante en condiciones no reductoras y se detectó CFI con un anticuerpo monoclonal de ratón para CFI humano (OX21, Thermo Fisher Scientific) y un anticuerpo de burro anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Abcam). CFI y CFico se expresaron en ambas líneas celulares. La transducción de líneas celulares con AAV.GFP sirvió como control negativo, mientras que 0,5 µg de CFI humano plasmático purificado (denominado en el presente documento "CFIpl") (Comptech) sirvió como control positivo. 4B: El sobrenadante se cargó en condiciones reductoras y el CFI se detectó con un antisuero de cabra contra CFI humano (Comptech) y el anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra (molécula completa) conjugado con peroxidasa (Sigma). El CFI apareció a 80 kDa (proenzima), 50 kDa (procesado; cadena pesada) y 35 kDa (procesado; cadena ligera). AAV.GFP sirvió como control negativo mientras que 0,5 µg de CFI humano plasmático purificado (Comptech) y suero humano normal (denominado "NHS" en este documento) al 10% sirvieron como control positivo. CFI y CFico se expresaron en ambas líneas celulares.

45 **Figura 5**
Un resultado representativo de un ensayo de escisión de C3b. El carril 1 muestra C3b incubado con CFH solamente. El carril 2 muestra C3b incubado con CFH y CFIpl. C3b se degrada por CFIpl a iC3b y C3dg. El carril 3 muestra C3b incubado con CFH y el sobrenadante de HEK-293 transducido con AAV.CFI. El carril 4-5 muestra C3b incubado con CFH y CFI inmunoprecipitado (designado como "CFI IP") de células ARPE-19 transducidas ya sea con AAV.CFI (carril 4) o AAV.CFico (carril 5). El carril 6-7 muestra C3b incubado con CFH y CFI inmunoprecipitado a partir de HEK-293 transducidas ya sea con AAV.CFI (carril 6) o AAV.CFico (carril 7).

55 **Figura 6**
Inmunotransferencia de CFI secretada a partir de células ARPE-19 cultivadas en Transwell. Las células no se diferenciaron en células hexagonales, sin embargo, se cultivaron como una monocapa confluyente de células y la división celular se redujo al mínimo mediante la adición de medio de suero al 1%. 6A: Se cargó el sobrenadante de ambos compartimentos en condiciones no reductoras y se realizó un análisis de transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal de ratón para CFI (Ap = compartimento apical y BI = compartimento basolateral). Se muestra que CFI se expresa a partir de una monocapa confluyente de células y que la proteína secretada se detecta en ambos compartimentos. 6B: Se realizó la tinción de los núcleos con Hoechst para confirmar la presencia de una monocapa de células (la tinción se realizó después de recolectar el sobrenadante).

60 **Figura 7**
Expresión de la proteína CFI de muestras agrupadas analizadas mediante inmunotransferencia. CFI se expresa a niveles detectables en todas las dosis y tanto de AAV.CFI como de AAV.CFico. Se cargó β-actina como control de carga. 7A: Se cargaron 40 µg de lisado de proteína en condiciones reductoras y se detectó CFI con un antisuero

- 5 policlonal de cabra para CFI humano. CFI se detecta como 80 kDa (proenzima), 50 kDa (procesado; cadena pesada) y 35 kDa (procesado; cadena ligera). Estas bandas corresponden al tamaño esperado de CFI y confirman el procesamiento, es decir, la presencia de cadenas pesadas y ligeras. 7B: También se cargó la misma cantidad de lisado de proteína para muestras de lisado de ojos inyectados con 10^9 gc/ ojo de AAV.CFIco o ojos no inyectados. El CFI se detectó con un anticuerpo monoclonal de ratón para CFI (izquierda, gel no reductor) y antisuero de cabra para CFI (derecha, gel reductor). El gel no reductor (izquierda) detecta CFI como una banda a 75 kDa en animales inyectados y no se detecta ninguna banda en el ojo no inyectado. En el gel reductor (derecha) CFI aparece como 80 kDa (proenzima), 50 kDa (procesado; cadena pesada) y 35 kDa (procesado; cadena ligera).
- 10 **Figura 8**
Análisis de expresión génica por qPCR.
- Figura 9**
15 Localización de hCFI en ojos inyectados en forma simulada (A-C), con AAV.CFI (D-F) y con AAV.CFIco (G-H). Las secciones de retina se marcaron doblemente con fibronectina (A, D y G) y hCFI (B, E y H). Los núcleos se tiñeron con DAPI y se muestran combinados (C, F e I). Scl: esclerótica, RPE: epitelio pigmentario de la retina, OS: segmento externo de fotorreceptores, IS: segmento interno de fotorreceptores, OPL: capa plexiforme externa, GCL: capa de células ganglionares, NFL: capa de fibra nerviosa, aumento: 20X, barra de escala: 50 μ m.
- 20 **Figura 10**
Localización de hCFI en ojos inyectados en forma simulada (A-C) y con AAV.CFI (D-F): mayor aumento del RPE. Las secciones de retina se marcaron doblemente con fibronectina (A y D) y hCFI (B y E). Los núcleos se tiñeron con DAPI y se muestran combinados (C y F). Scl: esclerótica, Bru: membrana de Bruch, Cho: coriocalpilaris, RPE: epitelio pigmentario de la retina, IPM: matriz inter fotorreceptora. aumento: 189X, barra de escala: 10 μ m. La tinción vesicular se representa con flechas, las microvellosidades del RPE están representadas en el borde inferior del RPE con estrellas.
- 25 **Figura 11**
Localización de hCFI en ojos inyectados en forma simulada (A-C) y con AAV.CFI (D-F): mayor aumento de las capas de fotorreceptores. Las secciones de retina se marcaron doblemente con fibronectina (A y D) y hCFI (B y E). Los núcleos se tiñeron con DAPI y se muestran combinados (C y F). IPM: matriz interfotorreceptora, OS: segmento externo, IS: segmento interno, ONL: capa nuclear externa. Aumento: 189X, barra de escala: 10 μ m.
- 30 **Figura 12**
Localización de hCFI en ojos inyectados en forma simulada (A-C) y con AAV.CFI (D-F): mayor aumento de la capa plexiforme externa (OPL). Las secciones de retina se marcaron doblemente con fibronectina (A y D) y hCFI (B y E). Los núcleos se tiñeron con DAPI y se muestran combinados (C y F). ONL: capa nuclear externa, INL: capa nuclear interna. Aumento: 189X, barra de escala: 10 μ m. La tinción de células horizontales se representa con flechas.
- 35 **Figura 13**
Localización de hCFI en ojos inyectados en forma simulada (A-C) y con AAV.CFI (D-F): mayor aumento de la capa de células ganglionares (GCL). Las secciones de retina se marcaron doblemente con fibronectina (A y D) y hCFI (B y E). Los núcleos se tiñeron con DAPI y se muestran combinados (C y F). IPL: capa plexiforme interna, NFL: capa de fibra nerviosa. Aumento: 189X, barra de escala: 10 μ m.
- 40 **Figura 14**
Localización de hCFI en ojos inyectados en forma simulada (A-C), y con AAV.CFI (D-F) y AAV.CFIco (G-H). El epitelio de pigmento retiniano de montaje completo se marcó doblemente con fibronectina (A, D y G) y hCFI (B, E y H). Aumento: 40X, barra de escala: 30 μ m.
- 45 **Descripción detallada de la invención**
- 50 **Sistema del complemento**
- 55 El sistema del complemento es una parte integral del sistema inmunológico humoral y está involucrado en la inflamación de los tejidos, la opsonización celular y la citólisis. Proporciona protección contra microorganismos y media en la eliminación de desechos celulares exógenos y endógenos de los tejidos del huésped.
- 60 La cascada del sistema del complemento se compone de cuatro vías de activación. Todas las vías terminan finalmente en la escisión central del factor C3 y en la generación de sus fragmentos activos C3a y C3b. C3a es la anafilatoxina que desencadena una variedad de respuestas quimiotácticas y proinflamatorias, tales como el reclutamiento de células inflamatorias y el aumento de la permeabilidad de la microvasculatura, mientras que C3b es responsable de la opsonización de superficies extrañas unidas covalentemente a C3b. La opsonización con fragmentos de C3 activados (C3b e iC3b) cumple tres funciones principales: (i) eliminación de desechos celulares por parte de células fagocíticas (por ejemplo, macrófagos o microglía) y estimulación del sistema inmunológico adaptativo (células B y T); (ii)
- 65

amplificación de la activación del complemento mediante la formación de una convertasa C3 unida a la superficie; y (iii) ensamblaje de la convertasa C5.

5 El ensamblaje de la convertasa C5 es responsable de la escisión de C5, que da como resultado la formación del complejo de ataque de la membrana citolítica (MAC) capaz de generar perforaciones en la membrana celular, promoviendo así la lisis celular y la eliminación de células innecesarias. A través de todas estas actividades, la cascada del complemento innato apoya y promueve la función de los mecanismos posteriores del sistema inmunológico que protegen la integridad del tejido del huésped. En general, la activación de la vía del sistema del complemento da como resultado una respuesta proinflamatoria, que incluye la generación de MAC, que media la lisis celular, la liberación de quimiocinas para atraer células inflamatorias al sitio del daño y la mejora de la permeabilidad capilar para promover la extravasación de leucocitos infiltrantes. En condiciones fisiológicas, la activación del complemento se controla eficazmente mediante la acción coordinada de moléculas reguladoras del complemento (CRM) solubles y asociadas a la membrana. Los reguladores solubles del complemento, como el inhibidor de C1, el inhibidor de anafilatoxinas, la proteína de unión a C4b (C4BP), el Factor H del complemento (CFH), el Factor I del complemento (CFI), la clusterina y la vitronectina, restringen la acción del complemento en los tejidos humanos en múltiples sitios de la reacción en cascada. Además, cada célula individual está protegida contra el ataque del complemento homólogo por proteínas de superficie, tales como el receptor 1 del complemento (CR1, CD35), la proteína cofactor de membrana (CD46) y proteínas ancladas en glicosilfosfatidilinositol, tales como el factor de aceleración de la descomposición (CD55) o molécula CD59. Es de destacar que las células y tejidos del huésped que están inadecuadamente protegidos del ataque del complemento pueden estar sujetos a lisis de células espectadoras.

La presente divulgación se refiere al tratamiento o la prevención de un trastorno del ojo mediado por el complemento. Por ejemplo, el trastorno mediado por el complemento puede ser un trastorno asociado con un defecto en la regulación de la vía alternativa y, en particular, con una sobreactividad del ciclo de retroalimentación de C3b del complemento y/o una baja actividad del ciclo de degradación de C3b.

En una realización, antes de la administración del vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención, el sujeto tiene niveles bajos (por ejemplo, niveles más bajos de lo normal) de actividad del Factor I, por ejemplo niveles bajos de actividad del Factor I en el ojo y/o niveles séricos bajos de actividad del Factor I. El nivel subnormal de actividad del Factor I puede deberse a una expresión subnormal del Factor I que funciona normalmente, o una expresión al menos parcial (por ejemplo, heterocigota) (a niveles normales o subnormales) de una variante no funcional o subfuncional del Factor I. (Tal sujeto puede portar una o más copias de un SNP asociado a AMD, por ejemplo, el sujeto puede ser homo o heterocigoto para una de las variantes raras del Factor I que se discuten más adelante). Por lo tanto el sujeto puede tener una baja concentración (por ejemplo, una concentración inferior a la normal) del Factor I en el ojo y/o suero. Para un sujeto humano, el nivel normal de actividad del Factor I (actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b) puede ser equivalente al proporcionado por 30-40 µg/mL del Factor I en el suero del sujeto. Por lo tanto, en un sujeto con baja actividad del Factor I, la actividad del Factor I en el suero puede corresponder a menos de 30 µg/mL y mayor a 0 µg/mL del Factor I, tal como 0-20 o 0-10 µg/mL (siendo estos intervalos de concentración en suero del Factor I que pueden abarcar a un sujeto que tiene una concentración baja de Factor I).

Por lo tanto, el sujeto a ser tratado por la presente invención puede sufrir un trastorno del ojo mediado por el complemento tal como AMD, más particularmente AMD seca (por ejemplo, caracterizada por atrofia geográfica), o puede estar en riesgo de desarrollar tal trastorno. Por ejemplo, el sujeto puede ser homocigoto o heterocigoto susceptible de uno o más SNP asociados con el trastorno mediado por el complemento.

En una realización, el sujeto está en riesgo de desarrollar AMD. Por ejemplo, el sujeto puede ser homocigoto o heterocigoto susceptible a uno o más SNP asociados con AMD, por ejemplo mutaciones raras en el Factor I asociadas con AMD avanzada que comúnmente dan como resultado niveles reducidos del Factor I en suero (Kavanagh et al., Hum Mol Genet. 1 de julio del 2015; 24 (13): 3861-70). En particular, el sujeto puede portar una o dos copias de una o más de las siguientes variantes raras del Factor I: rs144082872 (que codifica P50A); 4:110687847 (que codifica P64L); rs141853578 (que codifica G119R); 4:110685721 (que codifica V152M); 4:110682846 (que codifica G162D); 4:110682801 (que codifica N177I); rs146444258 (que codifica A240G); rs182078921 (que codifica G287R); rs41278047 (que codifica K441R); rs121964913 (que codifica R474).

Los métodos descritos en el presente documento pueden comprender además determinar si el sujeto tiene riesgo de desarrollar un trastorno mediado por el complemento (por ejemplo, AMD), por ejemplo, determinando si el sujeto es homocigoto o heterocigoto susceptible a uno o más SNP asociados con el trastorno mediado por el complemento (por ejemplo, determinando si el sujeto es homocigoto o heterocigoto susceptible a una o más de las variantes raras del Factor I asociadas con AMD enumeradas anteriormente).

Alternativamente, el sujeto puede tener un nivel normal de actividad o concentración del Factor I endógeno, por ejemplo en el ojo y/o suero y/o puede no portar una variante rara del alelo del Factor I.

65 En una realización, la administración del vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención aumenta así el nivel de actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b en el ojo del sujeto. En otra

realización, la administración del vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención aumenta así el nivel de actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b en el ojo del sujeto a un nivel que excede un nivel normal en el ojo. Más particularmente, el nivel de actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b aumenta en el RPE del ojo.

5 Se apreciará que la actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b en el sujeto después de la expresión del Factor I o fragmento del mismo a partir del vector AAV de la invención puede comprender la actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b del Factor I endógeno del sujeto (es decir, el Factor I del sujeto no producido por la expresión del vector AAV) y la actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b producida por la expresión del vector AAV de la invención, de modo que el nivel total de inactivación de C3b y de degradación de iC3b en el sujeto supera un nivel normal.

10 En una realización, el nivel de actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b en el sujeto, por ejemplo en el ojo, aumenta a un nivel que está al menos 5%, 10%, 15%, 20% o 25% por encima del nivel normal.

15 En otra realización, el nivel de actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b en el sujeto, por ejemplo en el ojo, aumenta hasta un nivel que es hasta el doble del nivel normal, o hasta el 80%, 60%, 40% o 20% por encima del nivel normal.

20 Por ejemplo, el nivel de actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b en el sujeto, por ejemplo en el ojo, puede aumentarse a un nivel que está 5-100%, 5-80%, 5-60%, 5-40%, 5-20%, 10-100%, 10-80%, 10-60%, 10-40%, 10-20%, 15-100%, 15-80%, 15-60%, 15-40%, 15-20%, 20-100%, 20-80%, 20-60%, 20-40%, 25-100%, 25-80%, 25-60% o 25-40% por encima del nivel normal.

25 En una realización, la administración del vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención no aumenta de forma detectable el nivel de actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b en el plasma/suero del sujeto. En otra realización, la administración del vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la invención no aumenta de forma detectable el nivel de actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b en el plasma/suero del sujeto a un nivel superior al nivel normal.

30 Como también se describe en el presente documento, antes de la administración de un vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de la divulgación, el sujeto puede tener niveles bajos (por ejemplo, niveles inferiores a los normales) de Factor H, por ejemplo niveles bajos de Factor H en el ojo y/o niveles en suero bajos del Factor H. Para un sujeto humano, el nivel normal del Factor H puede ser de aproximadamente 200-500 µg/mL en el suero del sujeto. Por lo tanto, en un sujeto con niveles bajos de Factor H, los niveles en el suero pueden ser menores de 200 µg/mL y mayores de 0 µg/mL, tal como 0-100 µg/mL. Alternativamente, el sujeto puede tener un nivel normal de Factor H endógeno, por ejemplo en el ojo y/o suero.

Factor I

40 El Factor I del complemento (Factor I, CFI), también conocido como inactivador de C3b/C4b, es una proteína que en humanos está codificada por el gen *CFI*.

45 El Factor I es una serina proteasa que circula en un estado similar a un zimógeno (Roversi et al.; PNAS; 2011; 108 (31): 12839-12844) a una concentración de -35 µg/mL (Nilsson et al.; Mol Immunol 2011, 48 (14): 1611-1620). La proteína del Factor I es un heterodímero fuertemente N-glicosilado que consta de dos cadenas polipeptídicas unidas por un solo enlace disulfuro. La cadena pesada (50 kDa) comprende una región del terminal N; un dominio del complejo de ataque de la membrana FI (FIMAC); un dominio de tipo CD5 o un dominio rico en cisteína del receptor eliminador (SRCR); dos dominios del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLr); y una región del terminal C de función desconocida que es un sitio de variabilidad de secuencia entre especies (Roversi et al.; como anteriormente). La cadena ligera (38 kDa) contiene el dominio de serina proteasa (SP) con los residuos catalíticos conservados (Goldberger et al.; J Biol Chem 1987, 262 (21): 10065-10071).

55 El Factor I inactiva C3b escindiéndolo en iC3b, C3d y C3d,g y, de forma análoga, C4b en C4c y C4d. Para realizar correctamente sus funciones, el Factor I requiere la presencia de proteínas cofactores tales como la proteína de unión a C4b (C4BP), el Factor H del complemento (CFH), el receptor 1 del complemento (CR1/CD35) y la proteína cofactor de la membrana (MCP/CD46) (Degen et al., Am J Hum Genet 2011, 88 (6): 689-705).

60 iC3b es incapaz de asociarse con el factor B y, por lo tanto, no puede perpetuar la amplificación de la cascada del complemento o la activación a través de la ruta alternativa. Por lo tanto, una vez que C3b se ha escindido en iC3b, no se produce ni el inicio de la ruta alternativa ni la activación de la cascada del complemento terminal.

65 iC3b es capaz de proporcionar una acción proinflamatoria al unirse y activar el receptor 3 del complemento (CR3) (CD11b/CD18) en leucocitos polimorfonucleares (principalmente neutrófilos), células NK y fagocitos mononucleares tales como macrófagos.

El Factor I es capaz de procesar iC3b en C3d,g mediante una actividad de proteasa que requiere el cofactor, CR1. C3d,g no puede unirse a CR3. Dado que iC3b reacciona con el receptor del complemento CR3 es un mecanismo principal por el cual la activación del complemento da lugar a inflamación, la degradación de iC3b en C3d,g es esencial para reducir la inflamación inducida por el complemento (Lachmann (2009), Adv. Immunol., 104: 115-149).

5 La capacidad única del Factor I para promover la escisión de C3b en iC3b y acelerar la degradación de iC3b, combinada con su concentración relativamente baja en el suero humano, con implicaciones para la cantidad requerida para su eficacia terapéutica, lo convierte en un objetivo ventajoso.

10 En una realización, un polipéptido del Factor I o un fragmento del mismo es capaz de escindir C3b en un producto de degradación inactivo. Por ejemplo, el polipéptido del Factor I o un fragmento del mismo puede ser capaz de escindir C3b en iC3b.

15 En una realización, un polipéptido del Factor I o un fragmento del mismo es capaz de procesar iC3b en un producto de degradación inactivo. Por ejemplo, el polipéptido del Factor I o un fragmento del mismo puede ser capaz de procesar iC3b en C3d,g.

20 En una realización preferida, el polipéptido del Factor I o un fragmento del mismo es capaz de escindir C3b en iC3b y procesar iC3b en C3d,g.

25 El fragmento del Factor I puede retener al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% de la actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b del Factor I nativo. La actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b del fragmento de Factor I, y del Factor I nativo, se puede determinar usando cualquier método adecuado conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la medición de la actividad proteolítica del Factor I se describe en Hsiung et al., (Biochem. J. (1982) 203, 293-298). Tanto los ensayos hemolíticos como los de aglutinación para la actividad de FI se describen en Lachmann PJ & Hobart MJ (1978) "Complement Technology" en Handbook of Experimental Immunology, 3ª edición, Ed DM Weir Blackwells Scientific Publications capítulo 5A página 17. Harrison RA (1996) proporciona una descripción más detallada, que también incluye un ensayo proteolítico, en "Weir's Handbook of Experimental Immunology", 5ª edición, Eds; Herzenberg Leonore A Weir DM, Herzenberg Leonard A y Blackwell C Publicaciones científicas de Blackwells, capítulo 75 páginas 36-37. El ensayo de aglutinación es muy sensible y se puede usar para detectar tanto la primera presilla (doble) que convierte C3b fijo en iC3b como la adquisición de reactividad con conglutinina; y para detectar la presilla final para C3dg comenzando con iC3b fijo y buscando la pérdida de reactividad con conglutinina. El ensayo hemolítico se utiliza para la conversión de C3b en iC3b y el ensayo proteolítico detecta todas las presillas.

35 En una realización, el Factor I es el Factor I humano.

40 Un ejemplo de proteína del Factor I humano es la proteína del Factor I humano que tiene el número de acceso UniProtKB P05156. Esta secuencia ejemplificada tiene una longitud de 583 aminoácidos (mostrada como la SEQ ID NO: 1) de los cuales los aminoácidos 1 a 18 forman una secuencia señal.

45 En una realización, la secuencia de aminoácidos del Factor I es la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 1. En una realización, la secuencia de aminoácidos del Factor I es la secuencia mostrada como las posiciones 19 a 583 de la SEQ ID NO: 1.

```

MKLLHVFLLF LCFHLRFCKV TYTSQEDLVE KKCLAKKYTH LSCDKVFCQP
WQRCIEGTCV CKLPYQCPKN GTAVCATNRR SFPTYCQQKS LECLHPGTKF

LNNGTCTAEG KFSVSLKHGN TDSEGIVEVK LVDQDKTMFI CKSSWSMREA
NVACLDLGFQ QGADTQRRFK LSDLSINSTE CLHVHCRGLE TSLAECTFTK
RRTMGYQDFA DVVCYTQKAD SPMDDFQCV NGKYISQMKA CDGINDCGDQ
SDELCKKACQ GKGFFHCKSGV CIPSQYQCNG EVDCITGEDE VGCAGFASVT
QEETEILTAD MDAERRRIKS LLPKLSCGVK NRMHIRRKRI VGGKRAQLGD
LPWQVAIKDA SGITCGGIYI GGCWILTAAH CLRASKTHRY QIWTTVVDWI
HPDLKRIVIE YVDRIIFHEN YNAGTYQNDI ALIEMKKDGN KKDCELPRSI
PACVPWSPYL FQPNDCIVS GWGREKDNER VFSLQWGEVK LISNCSKFYG
NRFYEKEMEC AGTYDGSIDA CKGDSGGPLV CMDANNVTYV WGVVSWGENC
GKPEFPGVYT KVANYFDWIS YHVGRPFISQ YNV
    
```

(SEQ ID NO: 1)

50 En una realización, la secuencia de aminoácidos del Factor I es la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 9, que corresponde al número de acceso de NCBI NP_000195. En una realización, la secuencia de aminoácidos del Factor I es la secuencia mostrada en las posiciones 19 a 583 de la SEQ ID NO: 9.

```
MKLLHVFLLF LCFHLRFCKV TYTSQEDLVE KKCLAKKYTH LSCDKVFCQP WQRCIEGTCV
CKLPYQCPKN GTAVCATNRR SFPTYCQOKS LECLHPGTFK LNNGTCTAEG KFSVSLKHGN
TDSEGIVEVK LVDQDKTMFI CKSSWSMREA NVACLDLGFQ QGADTQRRFK LSDLSINSTE
CLHVHCRGLE TSLAECTFTK RRTMGYQDFA DVVCYTQKAD SPMDFFFQCV NGKYISQMK
CDGINDCGDQ SDELCKKACQ GKGFHCKSGV CIPSYQCNG EVDCITGEDE VGCAGFASVA
QEETEILTAD MDAERRRIKS LLPKLSCGVK NRMHIRRKRI VGGKRAQLGD LPWQVAIKDA
SGITCGGIYI GGCWILTAAH CLRASKTHRY QIWTTVVDWI HPDLKRIVIE YVDRIIFHEN
YNAGTYQNDI ALIEMKKDGN KKDCLEPRSI PACVPWSPYL FQPNDTCIVS GWGREKDNER
VFSLQWGEVK LISNCSKFGY NRFYEKEMEC AGTYDGSIDA CKGDSGGPLV CMDANNVTYV
WGVVSWGENC GKPEFFPGVYT KVANYFDWIS YHVGRPFISQ YNV
```

(SEQ ID NO: 9)

5 Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I es la secuencia de nucleótidos que tiene el número de acceso de NCBI NM_000204. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I es la secuencia de nucleótidos que tiene el número de acceso de NCBI NM_000204.

En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I es la secuencia de nucleótidos mostrada como la SEQ ID NO: 2.

10

```
atgaagcttc ttcattgtttt cctgttattt ctgtgcttcc acttaagggtt ttgcaagggtc
acttatacat ctcaagagga tctgggtggag aaaaagtgtc tagcaaaaaa atatactcac
ctctcctgcg ataaagtctt ctgccagcca tggcagagat gcattgaggg cacctgtggtt
tgtaaaactac cgtatcagtg cccaaagaat ggcactgcag tgtgtgcaac taacaggaga
agcttcccaa catactgtca acaaaagagt ttggaatgtc ttcattccagg gacaaagttt
ttaaataacg gaacatgcac agccgaagga aagtttagtg tttccttgaa gcatggaaat
acagattcag agggaatagt tgaagtaaaa cttgtggacc aagataagac aatgttcata
tgcaaaagca gctggagcat gagggaagcc aacgtggcct gccttgacct tgggtttcaa
caaggtgctg atactcaaag aaggtttaag ttgtctgac tctctataaa tccactgaa
tgtctacatg tgcattgccg aggattagag accagtttgg ctgaatgtac ttttactaag
agaagaacta tgggttacca ggatttcgct gatgtggtt gttatacaca gaaagcagat
tctccaatgg atgacttctt tcagtgtgtg aatgggaaat acatttctca gatgaaagcc
tgtgatggta tcaatgattg tggagaccaa agtcatgaac tgtgttgtaa agcatgccaa
ggcaaaggct tccattgcaa atcgggtggt tgcattccaa gccagtatca atgcaatggt
gaggtggact gcattacagg ggaagatgaa gttggctgtg caggctttgc atctgtggct
caagaagaaa cagaaatttt gactgctgac atggatgag aaagaagacg gataaaatca
ttattaccta aactatcttg tggagttaaa aacagaatgc acattcgaag gaaacgaatt
gtgggaggaa agcagacaca actgggagac ctcccatggc aggtggcaat taaggatgcc
agtggaatca cctgtggggg aatttatatt ggtggctgtt ggattctgac tgctgcacat

tgtctcagag ccagtaaaac tcatcgttac caaatatgga caacagtagt agactggata
caccgccgacc ttaaactgat agtaattgaa tacgtggata gaattatttt ccatgaaaac
tacaatgcag gcacttacca aatgacatc gctttgattg aatgaaaaa agacggaaac
aaaaaagatt gtgagctgcc tcgttccatc cctgcctgtg tcccctggtc tcttaccta
ttccaacctt atgatacatg catcgtttct ggctggggac gagaaaaaga taacgaaaga
gtcttttcac ttcagtgggg tgaagttaaa ctaataagca actgctctaa gttttacgga
aatcgtttct atgaaaaaga aatggaatgt gcaggatcat atgatgggtc catcgatgcc
tgtaaagggg actctggagg ccccttagtc tgtatggatg ccaacaatgt gacttatgtc
tgggtgtgtg tgagttgggg ggaaaactgt ggaaaaccag agttcccagg tgtttacacc
aaagtggcca attattttga ctggattagc taccatgtag gaaggccttt tatttctcag
tacaatgtat aa
```

(SEQ ID NO: 2)

15 Las secuencias de nucleótidos utilizadas en la invención pueden tener codones optimizados. La optimización de codones se ha descrito previamente en los documentos WO 1999/041397 y WO 2001/079518. Las diferentes células difieren en el uso de codones particulares. Este sesgo de codones corresponde a un sesgo en la abundancia relativa de ARNt particulares en el tipo de célula. Alterando los codones en la secuencia para que se adapten a la abundancia relativa de los ARNt correspondientes, es posible aumentar la expresión. De la misma manera, es posible disminuir la expresión eligiendo deliberadamente codones para los que se sabe que los ARNt correspondientes son raros en el tipo de célula particular. Por lo tanto, se dispone de un grado adicional de control de la traducción.

20

En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I es la secuencia de nucleótidos mostrada como la SEQ ID NO: 8.

```

ATGAAGCTGCTGCATGTCTTTCTGCTGTTTCTGTGCTTCCATCTGCGGTTCTGTAAAGTGACCTATACTAGC
CAGGAGGATCTGGTGGAGAAGAAGTGTCTGGCCAAGAAGTACACACACCTGAGCTGCGACAAGGTGTTCTGT
CAGCCTTGGCAGCGGTGCATCGAGGGCACCTGCGTGTGCAAGCTGCCTTACCAGTGCCCAAAGAACGGCACC
GCCGTGTGCGCCACAAATCGGAGATCTTTTCCAACATATTGCCAGCAGAAGAGCCTGGAGTGTCTGCACCCC
GGCACCAAGTTCCTGAACAATGGCACCTGCACAGCCGAGGGCAAGTTTTCTGTGAGCCTGAAGCACGGCAAC
ACAGATAGCGAGGGCATCGTGGAGGTGAAGCTGGTGGACCAGGATAAGACCATGTTTCATCTGTAAGAGCTCC
TGGTCCATGAGGGAGGCAAACGTGGCATGCCTGGATCTGGGATTCCAGCAGGGAGCAGACACACAGAGGCGC
TTAAGCTGTCCGACCTGTCTATCAATAGCACCGAGTGCCTGCACGTGCACTGTAGGGGCTGGAGACATCC
CTGGCAGAGTGCACCTTCACAAAGCGGAGAACCATGGGCTACCAGGACTTTGCCGACGTGGTGTGCTATACC
CAGAAGGCCGATAGCCCCATGGACGATTTCTTTCACTGCGTGAACGGCAAGTATATCTCCAGATGAAGGCC
TGCGACGGCATCAATGACTGTGGCGATCAGTCTGACGAGCTGTGCTGTAAGCCTGTGAGGGCAAGGGCTTC
CACTGCAAGAGCGGCGTGTGCATCCCTTCCAGTACCAGTGCACCGCGAGGTGGATTGTATCACAGGAGAG
GACGAAGTGGGATGCGCAGGATTTGCATCTGTGGCACAGGAGGAGACAGAGATCCTGCAGCCGACATGGAT
GCCGAGAGGCGCCGGATCAAGTCTCTGCTGCCAAGCTGAGCTGAGCTGTGGCGTGAAGAATCGGATGCACATCAGA
AGGAAGCCATCGTGGGAGGCAAGAGGGCACAGCTGGGCGATCTGCCATGGCAGGTGGCCATCAAGGACGCC
TCTGGCATCACCTGCGGCGGCATCTACATCGGAGGATGTTGGATCCTGACCGCAGCACACTGCCTGAGAGCA
AGCAAGACACACAGGTATCAGATCTGGACCACAGTGGTGGATTGGATCCACCCAGACCTGAAGAGATCGTG
ATCGAGTACGTGGATAGGATCATCTTTACAGAGAACAACAATGCCGGCACATATCAGAACGACATCGCCCTG
ATCGAGATGAAGAAGGATGGCAATAAGAAGGACTGTGAGCTGCCAGATCCATCCCTGCATGCGTGGCATGG
AGCCCTATCTGTTCCAGCCCAACGATACCTGCATCGTGTCCGGATGGGGAAGGGAGAGGACAATGAGCGG
GTGTTTTCTCTGCAGTGGGCGAGGTGAAGCTGATCTCCAAGTCTTAAGTTCTACGGCAATAGGTTTTAT
GAGAAGGAGATGGAGTGGCGCCGCACCTACGATGGCAGCATCGACGCTGTAAGGGCGATTCCGGAGGACCA
CTGGTGTGCATGGACGCAAACAATGTGACATACGTGTGGGGAGTGGTGTCTGGGGAGAGAAGTGGGCAAG
CCAGAGTTCCCGGCGTATATACCAAGGTGGCCAATTATTTTGATTGGATTTCCTACCACGTGGGACGGCCC
TTTATTTCCAGTATAATGTCTAA
    
```

(SEQ ID NO: 8)

5 La secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o un fragmento del mismo puede comprender, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 2 u 8, en la que la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos retiene sustancialmente una actividad funcional de la proteína representada por la SEQ ID NO: 1 o 9.

10 La secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o un fragmento del mismo puede comprender, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o 100 % de identidad con la secuencia mostrada como las posiciones 55 a 1752 de la SEQ ID NO: 2 u 8, en la que la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos retiene sustancialmente una actividad funcional de la proteína representada por la SEQ ID NO: 1 o 9.

15 La secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o un fragmento del mismo puede, por ejemplo, codificar una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 1 o 9, en la que la secuencia de aminoácidos retiene sustancialmente una actividad funcional de la proteína representada por la SEQ ID NO: 1 o 9.

20 La secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o un fragmento del mismo puede, por ejemplo, codificar una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o 100% de identidad con la secuencia mostrada como las posiciones 19 a 583 de la SEQ ID NO: 1 o 9, en la que la secuencia de aminoácidos retiene sustancialmente una actividad funcional de la proteína representada por la SEQ ID NO: 1 o 9.

25 Una ventaja de la invención es que el Factor I es particularmente difícil de preparar en forma de proteína purificada. En consecuencia, los inventores han ideado una forma de modular el sistema del complemento, por ejemplo para permitir tratamientos de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), administrando el Factor I en forma de un vector AAV que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I. El vector AAV se puede administrar a un sitio de interés, por ejemplo, el ojo, para permitir la traducción *in situ* del polipéptido del Factor I.

Factor H

35 El Factor H del complemento (Factor H, CFH) es una proteína de control del complemento.

Es una glicoproteína soluble grande (155 kDa) que está presente en el plasma humano a una concentración típica de 200-300 µg/mL (Hakobyan et al.; 2008; 49 (5): 1983-90). La función principal del Factor H es regular la vía alternativa del sistema del complemento.

40

El Factor H proporciona actividad cofactor para la escisión de C3b mediada por el Factor I. El Factor H también aumenta la velocidad de disociación del complejo C3bBb (convertasa C3) y el complejo (C3b)NBB (convertasa C5) y, por lo tanto, reduce la actividad de la vía alternativa del complemento.

5 El Factor H se compone de 20 módulos de proteína de control del complemento (CCP) (también conocidos como repeticiones de consenso cortas o dominios sushi) conectados entre sí mediante conectores cortos (de entre tres y ocho residuos de aminoácidos) y dispuestos en una forma extendida de la cabeza a la cola. Cada uno de los módulos CCP consta de alrededor de 60 aminoácidos con cuatro residuos de cisteína unidos por disulfuro en una disposición 1-3 2-4, y un núcleo hidrófobo construido alrededor de un residuo de triptófano casi invariante. Los módulos CCP están
10 numerados del 1 al 20 (desde el extremo terminal N de la proteína). Los CCP 1-4 y los CCP 19-20 interactúan con C3b mientras que los CCP 7 y los CCP 19-20 se unen a GAG y ácido siálico (Schmidt et al.; 2008; Journal of Immunology 181 (4): 2610-9).

15 Se ha demostrado que la terapia génica que usa Factor H puede mejorar la patología similar a AMD inducida en ratones (Cashman et al., (2015) J. Gene Med. 17: 229-243). Los ratones se coinyectaron subretinalmente con: (i) un vector adenoviral que expresa el componente C3 del complemento, que se había demostrado previamente que recapitula muchas características patológicas de la AMD humana; y (ii) un vector adenoviral que expresa el Factor H. En relación con los animales de control que recibieron GFP en lugar de Factor H, los ratones transducidos con el Factor H mostraron una reducción del 91% en la proliferación de células endoteliales y una atenuación del 69% de la
20 atrofia del RPE. La electroretinografía mostró una función retiniana mejorada en ratones que recibieron Factor H, y la inmunocitoquímica de rodopsina y RPE65 fue consistente con el rescate de fotorreceptores y RPE en tales animales.

25 En una realización, un polipéptido del Factor H o un fragmento o derivado del mismo es capaz de actuar como cofactor para la escisión de C3b mediada por el Factor I. En una realización, un polipéptido del Factor H o un fragmento o derivado del mismo es capaz de aumentar la velocidad de disociación de la convertasa C3 y la convertasa C5.

30 En una realización preferida, un polipéptido del Factor H o un fragmento o derivado del mismo es capaz de actuar como cofactor para la escisión de C3b mediada por el Factor I y aumentar la velocidad de disociación de convertasa C3 y convertasa C5.

En una realización, el Factor H es el Factor H humano.

35 Un ejemplo de proteína del Factor H humano es la proteína del Factor H humano que tiene el número de acceso UniProtKB P08603. Esta secuencia ejemplificada tiene 1231 aminoácidos de longitud (mostrada como la SEQ ID NO: 3) de los cuales los aminoácidos 1 a 18 forman una secuencia señal.

40 En una realización, la secuencia de aminoácidos del Factor H es la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 3. En una realización, la secuencia de aminoácidos del Factor H es la secuencia mostrada como las posiciones 19 a 1231 de la SEQ ID NO: 3.

ES 2 828 050 T3

```

MRLLAIIICL MLWAICVAED CNELPPRRNT EILTGWSWSDQ TYPEGTQAIY
KCRPGYRSLG NVIMVCRKGE WVALNPLRKC QKRPCGHPGD TPFGTFTLTG
GNVFEYGVKA VYTCNEGYQL LGEINYRECD TDGWTNDIPI CEVVKCLPVT
APENGKIVSS AMEPDREYHF GQAVRFVCNS GYKIEGDEEM HCSDDGFWSK
EKPKCVEISC KSPDVINGSP ISQKIIYKEN ERFQYKCNMG YEYSERGDAV
CTESGWRPLP SCEEKSCDNP YIPNGDYSPL RIKHRTGDEI TYQCRNGFYP
ATRGNTAKCT STGWIPAPRC TLKPCDYPI KHGGLYHENM RRPYFPVAVG
KYYSYCYDEH FETPSGSYWD HIHCTQDGWS PAVPCLRKCY FPYLENGYNQ
NYGRKFVQ GK SIDVACHPGY ALPKAQTTVT CMENGWSPTP RCIRVKTCSK
SSIDIENGF I SESQYTYALK EKAKYQCKLG YVTADGETSG SITCGKDGWS
AQPTCIKSCD IPVFMNARTK NDFTWFKLND TLDYECHDGY ESNTGSTTGS
IVCGYNGWSD LPICYERECE LPKIDVHLVP DRKKDQYKVG EVLKFSCCKPG
FTIVGPNSVQ CYHFGLSPDL PICKEQVQSC GPPPELLNGN VKEKTKEEYQ
HSEVVEYYCN PRFLMKGPNK IQCVDGEWTT LPVCIVEEST CGDIPELEHG
WAQLSSPPYY YGDSVEFNCS ESFTMIGHRS ITCIHGVWTQ LPQCVAIDKL
KKCKSSNLII LEEHLKKNKE FDHNSNIRYR CRGKEGWIHT VCINGRWDPE
VNC SMAQIQL C P P P P Q I P N S H N M T T T L N Y R D G E K V S V L C Q E N Y L I Q E G E E
ITCKDGRWQS I P L C V E K I P C S Q P P Q I E H G T I N S S R S S Q E S Y A H G T K L S Y T
CEGGFRISEE N E T T C Y M G K W S S P P Q C E G L P C K S P P E I S H G V V A H M S D S Y Q
Y G E E V T Y K C F E G F G I D G P A I A K C L G E K W S H P P S C I K T D C L S L P S F E N A I P
M G E K K D V Y K A G E Q V T Y T C A T Y Y K M D G A S N V T C I N S R W T G R P T C R D T S C V N
P P T V Q N A Y I V S R Q M S K Y P S G E R V R Y Q C R S P Y E M F G D E E V M C L N G N W T E P P
Q C K D S T G K C G P P P P I D N G D I T S F P L S V Y A P A S S V E Y Q C Q N L Y Q L E G N K R I
T C R N G Q W S E P P K C L H P C V I S R E I M E N Y N I A L R W T A K Q K L Y S R T G E S V E F V
C K R G Y R L S S R S H T L R T T C W D G K L E Y P T C A K R

```

(SEQ ID NO: 3)

5 Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos que codifica el Factor H es la secuencia de nucleótidos que tiene el número de acceso de NCBI NM_000186. En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor H es la secuencia de nucleótidos que tiene el número de acceso de NCBI NM_000186.

En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor H es la secuencia de nucleótidos mostrada como la SEQ ID NO: 4.

```

atgagacttc tagcaaagat tatttgcctt atgttatggg ctatttgtgt agcagaagat
tgcaatgaac ttctccaag aagaaataca gaaattctga caggttcctg gtctgaccaa
acatatccag aaggcaccga ggctatctat aaatgccgcc ctggatatag atctcttgga
aatgtaataa tggatgagc gaaggagaa tgggttgctc ttaatccatt aaggaaatgt
cagaaaaggc cctgtggaca tcctggagat actccttttg gtacttttac ccttacagga
ggaaatgtgt ttgaatatgg tgtaaaagct gtgtatacat gtaatgaggg gtatcaattg
ctaggtgaga ttaattaccg tgaatgtgac acagatggat ggaccaatga tattcctata
tgtgaagtgt tgaagtgttt accagtgaca gcaccagaga atggaaaaat tgtcagtagt
gcaatggaac cagatcggga ataccatctt ggacaagcag tacggtttgt atgtaactca
ggctacaaga ttgaaggaga tgaagaaatg cattgttcag acgatggttt ttggagtaaa
gagaaaccaa agtgtgtgga aatttcatgc aaatccccag atgttataaa tggatctcct
atatctcaga agattattha taaggagaat gaacgatttc aatataaatg taacatgggt
tatgaataca gtgaaagagg agatgctgta tgcactgaat ctggatggcg tccgttgctc
tcatgtgaag aaaaatcatg tgataatcct tatattccaa atggtgacta ctcacctta
aggattaaac acagaactgg agatgaaatc acgtaccagt gtagaaatgg tttttatcct
gcaacccggg gaaatacagc aaaatgcaca agtactggct ggatacctgc tccgagatgt
accttgaaac cttgtgatta tccagacatt aaacatggag gtctatatca tgagaatatg
cgtagaccat actttccagt agctgtagga aaatattact cctattactg tgatgaacat
tttgagactc cgtcaggaag ttactgggat cacattcatt gcacacaaga tggatggtcg

```

10

ES 2 828 050 T3

```

ccagcagtac catgcctcag aaaatgttat tttccttatt tggaaaatgg atataatcaa
aatcatggaa gaaagtttgt acagggtaaa tctatagacg ttgcctgcca tcctggctac
gctcttccaa aagcgcagac cacagttaca tgtatggaga atggctggctc tcctactccc
agatgcatcc gtgtcaaaaac atgttccaaa tcaagtatag atattgagaa tgggtttatt
tctgaatctc agtatacata tgccttaaaa gaaaaagcga aatatcaatg caaactagga
tatgtaacag cagatggtga aacatcagga tcaattacat gtgggaaaga tggatggtca
gtcaaccca cgtgcattaa atcttgtgat atcccagtat ttatgaatgc cagaactaaa
aatgacttca catggtttaa gctgaatgac acattggact atgaaatgcca tggatggtat
gaaagcaata ctggaagcac cactggttcc atagtgtgtg gttacaatgg ttggtctgat
ttaccatata gttatgaaag agaatgcgaa cttcctaaaa tagatgtaca cttagtctct
gatcgcaaga aagaccagta taaagttgga gaggtgttga aattctcctg caaacagga
tttacaatag ttggaccta tcccgttcag tgctaccact ttggattgtc tcctgacctc
ccaatatgta aagagcaagt acaatcatgt ggtccacctc ctgaactcct caatgggaat
gtaagggaaa aaacgaaaga agaatatgga cacagtgaag tgggtgaaata ttattgcaat
cctagatttc taatgaaggg acctaataaa attcaatgtg ttgatggaga tgggcaact
ttaccagtgt gtattgtgga ggagagtacc tgtggagata tacctgaact tgaacatggc
tgggcccagc tttcttcccc tccttattac tatggagatt cagtggaatt caattgtctca
gaatcattta caatgattgg acacagatca attacgtgta ttcattggagt atggaccaa
cttccccagt gtgtggcaat agataaactt aagaagtgca aatcatcaaa ttttaattata
cttgaggaac atttaaaaaa caagaaggaa ttcgatcata attctaacat aaggtacaga
tgtagaggaa aagaaggatg gatacacaca gtctgcataa atggaagatg ggtaccagaa
gtgaactgct caatggcaca aatacaatta tgcccacctc cacctcagat tcccattct
cacaatatga caaccacct gaattatcgg gatggagaaa aagtatctgt tctttgcaa
gaaaattatc taattcagga aggagaagaa attacatgca aagatggaag atggcagtca
ataccactct gtgttgaaaa aattccatgt tcacaaccac ctcagataga acacggaacc
attaattcat ccaggctctc acaagaaagt tatgcacatg ggactaaatt gagtatact
tgtgagggtg gtttcaggat atctgaagaa aatgaaacaa catgctacat gggaaaatgg
agttctccac ctcagtgtga aggccttctc tgtaaatctc cacctgagat ttctcatggt
gtttagctc acatgtcaga cagttatcag tatggagaag aagttacgta caaatgtttt
gaaggtttg gaattgatgg gccctgcaatt gcaaaatgct taggagaaaa atggtctcac
cctccatcat gcataaaaac agattgtctc agtttaccta gctttgaaaa tgccataacc
atgggagaga agaaggatgt gtataaggcg ggtgagcaag tgacttacac ttgtgcaaca
tattacaaaa tggatggagc cagtaatgta acatgcatta atagcagatg gacaggaagg
ccaacatgca gagacacctc ctgtgtgaat ccgcccacag taaaaaatgc ttatatagtg
tcgagacaga tgagtaaata tccatctggt gagagagtac gttatcaatg taggagccct
tatgaaatgt ttggggatga agaagtgatg tgtttaaatg gaaactggac ggaaccacct
caatgcaagg attctacagg aaaatgtggg cccctccac ctattgacaa tggggacatt
acttcattcc cgttgtcagt atatgctcca gcttcatcag ttgagtacca atgccagaac
ttgtatcaac ttgagggtaa caagcgaata acatgtagaa atggacaatg gtcagaacca
ccaaaatgct tacatccgtg tgtaatatcc cgagaaatta tggaaaatta taacatagca
ttaaggtgga cagccaaaca gaagctttat tcgagaacag gtgaatcagt tgaatttgtg
tgtaaacggg gatatcgtct tcatcacgt tctcacacat tgcgaacaac atgttgggat
gggaaactgg agtatccaac ttgtgcaaaa agatag

```

(SEQ ID NO: 4)

5 La secuencia de nucleótidos que codifica el Factor H o un fragmento o derivado del mismo puede, por ejemplo, comprender una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 4, en la que la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos retiene sustancialmente una actividad funcional de la proteína representada por la SEQ ID NO: 3.

10 La secuencia de nucleótidos que codifica el Factor H o un fragmento o derivado del mismo puede, por ejemplo, comprender una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o 100% de identidad con la secuencia mostrada como las posiciones 55 a 3696 de la SEQ ID NO: 4, en la que la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos retiene sustancialmente una actividad funcional de la proteína representada por la SEQ ID NO: 3.

15 La secuencia de nucleótidos que codifica el Factor H de la presente invención puede, por ejemplo, codificar una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 3, en la que la secuencia de aminoácidos retiene sustancialmente una actividad funcional de la proteína representada por la SEQ ID NO: 3.

20 La secuencia de nucleótidos que codifica el Factor H de la presente invención puede, por ejemplo, codificar una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o 100% de identidad con

la secuencia mostrada como las posiciones 19 a 1231 de la SEQ ID NO: 3, en la que la secuencia de aminoácidos retiene sustancialmente una actividad funcional de la proteína representada por la SEQ ID NO: 3.

Factor D

5 El Factor D del complemento (Factor D, CFD) está implicado en la ruta alternativa del complemento del sistema del complemento. Funciona para escindir el Factor B en el Factor Bb y Ba.

10 El Factor D es un miembro de la familia de peptidasas de tripsina. Todos los miembros de la familia de las serina proteasas de la quimotripsina tienen estructuras muy similares. En todos los casos, incluido el Factor D, hay dos dominios de barril β antiparalelos y cada barril contiene seis cadenas β con la misma tipología en todas las enzimas. La principal diferencia en la estructura de la cadena principal entre el Factor D y las otras serina proteasas de la familia de las quimotripsinas está en los bucles de superficie que conectan los elementos estructurales secundarios.

15 La cascada alternativa de activación del complemento se inicia mediante la hidrólisis espontánea de C3, que es abundante en el plasma sanguíneo. La "activación al ralentí (tickover)" se produce a través de la escisión espontánea del enlace tioéster en C3 para formar C3(H₂O).

20 Este cambio de forma permite la unión de la proteína plasmática Factor B, lo que permite que el Factor D escinda el Factor B en Ba y Bb. Bb sigue siendo parte del C3(H₂O) para formar C3(H₂O)Bb. Este complejo también se conoce como C3-convertasa en fase fluida. Esta convertasa, aunque solo se produce en pequeñas cantidades, puede escindir múltiples proteínas C3 en C3a y C3b.

25 El vector AAV de la presente invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-Factor D.

30 El anticuerpo anti-Factor D puede unirse al Factor D y reducir o prevenir una actividad funcional del Factor D. Por ejemplo, el anticuerpo anti-Factor D puede reducir o prevenir que el Factor D se una al Factor B y/o el Factor D se escinda del Factor B.

Se conocen en la técnica anticuerpos anti-Factor D adecuados. Dichos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, lampalizumab.

Componente 5 del complemento

35 El componente 5 del complemento (C5) es el quinto componente del complemento, que juega un papel importante en los procesos inflamatorios y de muerte celular. C5 está compuesto por cadenas polipeptídicas alfa y beta que están unidas por un puente disulfuro.

40 La proteasa C5-convertasa escinde C5 en el componente 5a del complemento (C5a) y fragmentos C5b. C5b es importante en los eventos tardíos de la cascada del complemento, mientras que C5a actúa como péptido altamente inflamatorio. El origen de C5 generalmente son los hepatocitos pero su síntesis también se puede encontrar en macrófagos y esto puede causar aumentos locales de C5a. C5a tiene propiedades quimiotácticas y anafilatóxicas, es esencial en la inmunidad innata pero también está ligada a la inmunidad adaptativa. El aumento de la producción de C5a está relacionado con una serie de enfermedades inflamatorias.

50 C5a es una anafilatoxina, que provoca una mayor expresión de moléculas de adhesión en el endotelio, contracción del músculo liso y una mayor permeabilidad vascular. C5a des-Arg (que carece de la arginina del terminal C) es una anafilatoxina mucho menos potente. Tanto C5a como C5a des-Arg pueden desencadenar la desgranulación de los mastocitos, liberando moléculas de histamina proinflamatorias y TNF- α . C5a también es un quimioatrayente eficaz, que inicia la acumulación de células fagocíticas y del complemento en los sitios de infección o el reclutamiento de células presentadoras de antígeno en los ganglios linfáticos. C5a juega un papel clave en el aumento de la migración y adherencia de neutrófilos y monocitos a las paredes de los vasos. Los glóbulos blancos se activan mediante la sobreexpresión de la avidéz por la integrina, la vía de la lipoxigenasa y el metabolismo del ácido araquidónico. C5a también modula el equilibrio entre los receptores Fc de IgG activadores frente a los inhibidores en los leucocitos, mejorando así la respuesta autoinmune.

55 El vector AAV de la presente invención puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-C5.

60 El anticuerpo anti-C5 puede unirse a C5 y prevenir la escisión de C5 en C5a y C5b.

Se conocen en la técnica anticuerpos anti-C5 adecuados. Dichos anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, eculizumab.

65 Anticuerpo

Un anticuerpo se refiere a cualquier parte de un anticuerpo o un fragmento del mismo que retiene la capacidad de unirse al mismo objetivo del antígeno que el anticuerpo parental.

5 El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico. Los anticuerpos quiméricos pueden producirse trasplantando dominios variables de anticuerpos de una especie (por ejemplo, un ratón) a dominios constantes de anticuerpos de otra especie (por ejemplo, un ser humano).

10 El anticuerpo puede ser un anticuerpo clásico de longitud completa. Por ejemplo, el anticuerpo puede ser una molécula de IgG, IgM o IgA.

15 El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo funcional. Los fragmentos de anticuerpos específicos incluyen, pero no se limitan a, (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1, (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1, (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo, (iv) el fragmento dAb, que consta de un solo dominio variable, (v) regiones CDR aisladas, (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos, (vii) moléculas Fv de cadena sencilla (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno, (viii) dímeros Fv de cadena sencilla biespecíficos, y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica. Los fragmentos de anticuerpos pueden modificarse. Por ejemplo, las moléculas pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL.

25 El anticuerpo descrito en el presente documento puede ser un anticuerpo multiespecífico y, en particular, un anticuerpo biespecífico, también denominado a veces "diacuerpos". Estos son anticuerpos que se unen a dos (o más) antígenos diferentes. El anticuerpo puede ser un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas similares a anticuerpos minimizadas que comprenden un scFv unido a un dominio CH3. En algunos casos, el scFv se puede unir a la región Fc y puede incluir parte o toda la región bisagra.

30 El anticuerpo puede ser un anticuerpo de dominio (también denominado anticuerpo de dominio único o nanocuerpo). Este es un fragmento de anticuerpo que contiene un dominio de anticuerpo variable único monomérico. Los ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen, pero no se limitan a, fragmentos VHH encontrados originalmente en camélidos y fragmentos VNAR encontrados originalmente en peces cartilagosos. También se pueden generar anticuerpos de dominio único dividiendo los dominios variables diméricos de moléculas de IgG comunes en monómeros.

35 El anticuerpo puede ser un anticuerpo sintético (también denominado mimético de anticuerpo). Los miméticos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Affibodies, DARPin, Anticalinas, Avimeros, Versabodies y Duocalinas.

Degeneración macular relacionada con la edad (AMD)

40 La progresión clínica de AMD se caracteriza en etapas de acuerdo con los cambios en la mácula. El sello distintivo de la AMD temprana son las drusas, que son acumulaciones de desechos extracelulares debajo de la retina y aparecen como manchas amarillas en la retina en el examen clínico y en las fotografías del fondo de ojo. Las drusas se clasifican por tamaño como pequeñas (< 63 µm), medianas (63-124 µm) y grandes (> 124 µm). También se consideran duras o blandas dependiendo del aspecto de sus márgenes en el examen oftalmológico. Mientras que las drusas duras tienen márgenes claramente definidas, las blandas tienen márgenes menos definidas y márgenes fluidos. La escala de gravedad fotográfica de fondo de ojo del estudio de enfermedades oculares relacionadas con la edad (AREDS) es uno de los principales sistemas de clasificación utilizados para esta afección.

50 La AMD se clasifica en formas "seca" y "húmeda" (exudativa o neovascular). La AMD seca es más común que la AMD húmeda, pero la forma seca puede progresar a la forma húmeda y las dos ocurren simultáneamente en un número significativo de casos. La AMD seca se caracteriza típicamente por la apoptosis progresiva de las células de la capa de RPE, las células fotorreceptoras superpuestas y, con frecuencia, también las células subyacentes de la capa capilar coroidea. Las áreas confluentes de muerte celular del RPE acompañadas de atrofia de los fotorreceptores suprayacentes se denominan atrofia geográfica (GA). Los pacientes con esta forma de AMD experimentan un deterioro lento y progresivo de la visión central.

60 La AMD húmeda se caracteriza por sangrado y/o pérdida de líquido de vasos anormales que han crecido desde los vasos coroides (coriocapilar) debajo del RPE y la mácula, que pueden ser responsables de la pérdida repentina e incapacitante de la visión. Se ha estimado que gran parte de la pérdida de visión que experimentan los pacientes se debe a dicha neovascularización coroidea (CNV) y sus complicaciones secundarias.

El tratamiento o la prevención de AMD descritos en este documento pueden reducir o prevenir la aparición de un fenotipo de AMD descrito anteriormente. Preferiblemente, el tratamiento de AMD permite el mantenimiento o mejora de la función visual.

65

5 En una realización, el tratamiento o la prevención de AMD da como resultado una prevención o una reducción de la formación de atrofia geográfica. En otra realización, el tratamiento o la prevención de AMD da como resultado una ralentización de la progresión de la atrofia geográfica. Por ejemplo, da como resultado una reducción de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% en el aumento del área de GA durante los 12 meses siguientes a la administración a un ojo tratado de un sujeto, en relación con un ojo no tratado durante el mismo período. En otra realización, el tratamiento o la prevención de AMD da como resultado el tratamiento de la atrofia geográfica, por ejemplo, una reducción en la cantidad de atrofia geográfica.

10 En una realización, el tratamiento o la prevención de AMD da como resultado una prevención o una reducción de la formación de drusas. En otra realización, el tratamiento o la prevención de AMD da como resultado una reducción de las drusas existentes, por ejemplo, una reducción del tamaño y/o número de drusas existentes.

15 En una realización, el tratamiento o la prevención de AMD da como resultado una prevención o reducción de la deposición del complemento. En otra realización, el tratamiento o la prevención de AMD da como resultado una reducción en la deposición del complemento existente.

20 En una realización, el tratamiento o la prevención de AMD da como resultado una mejora o restauración de la visión o agudeza visual. En otra realización, el tratamiento o la prevención de la AMD mitiga la pérdida de visión o agudeza visual.

En una realización, el tratamiento o la prevención de AMD da como resultado una mejora o restauración de la velocidad de lectura en un sujeto. En otra realización, el tratamiento o la prevención de AMD mitiga la reducción de la velocidad de lectura en un sujeto.

25 En una realización, el tratamiento o la prevención de AMD da como resultado una reducción o prevención de la pérdida de fotorreceptores y/o del epitelio pigmentario de la retina (RPE).

Retinopatía diabética

30 La retinopatía diabética es una condición caracterizada por daño a los vasos sanguíneos de la retina, que es causado por los niveles altos de azúcar en sangre asociados con la diabetes. Si no se trata, la retinopatía diabética puede causar ceguera.

35 Aunque los sujetos con retinopatía diabética leve pueden tener buena visión, dos tipos de retinopatía diabética, a saber, edema macular diabético (DMO) y retinopatía diabética proliferativa (PDR) pueden amenazar la visión del sujeto.

40 El edema macular diabético se caracteriza por la fuga de líquido de los vasos sanguíneos dañados en la parte posterior del ojo. El líquido filtrado se acumula en la mácula, lo que provoca hinchazón y visión borrosa. Esto eventualmente puede dar lugar a una visión central deficiente y una incapacidad para leer o conducir. La visión lateral suele permanecer normal.

45 La retinopatía diabética proliferativa se caracteriza por el cierre de los vasos sanguíneos de la retina, lo que conduce al crecimiento de vasos sanguíneos frágiles y anormales en la superficie de la retina. Esto puede resultar en la pérdida permanente de la visión debido a hemorragia en el ojo, cicatrización y desprendimiento de retina.

Estructura del ojo

50 Los medicamentos descritos en el presente documento pueden administrarse a un mamífero, preferiblemente al ojo humano, en relación con el tratamiento o la prevención de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

La persona experta en el tratamiento de enfermedades del ojo tendrá un conocimiento detallado y completo de la estructura del ojo. Sin embargo, se describen las siguientes estructuras de particular relevancia para la invención.

55 Retina

60 La retina es la membrana de múltiples capas, que recubre la cámara posterior interna del ojo y detecta una imagen del mundo visual que se comunica al cerebro a través del nervio óptico. En orden desde el interior hacia el exterior del ojo, la retina comprende las capas de la retina neurosensorial y el epitelio pigmentario de la retina, y la coroides se encuentran fuera del epitelio pigmentario de la retina.

Retina neurosensorial y células fotorreceptoras

65 La retina neurosensorial alberga las células fotorreceptoras que detectan directamente la luz. Consta de las siguientes capas: membrana limitadora interna (ILM); capa de fibras nerviosas; capa de células ganglionares; capa plexiforme

interna; capa nuclear interna; capa plexiforme externa; capa nuclear externa (núcleos de los fotorreceptores); membrana limitante externa (ELM); y fotorreceptores (segmentos internos y externos de los bastones y conos).

5 El experto en la materia tendrá un conocimiento detallado de las células fotorreceptoras. En resumen, las células fotorreceptoras son neuronas especializadas ubicadas en la retina que convierten la luz en señales biológicas. Las células fotorreceptoras comprenden células de bastón y cono, que se distribuyen de manera diferente a través de la retina.

10 Las células de bastón se distribuyen principalmente a través de las partes externas de la retina. Son muy sensibles y permiten la visión a niveles bajos de luz. Hay en promedio alrededor de 125 millones de células bastón en una retina humana normal.

15 Las células cónicas se encuentran a través de la retina, pero están particularmente altamente concentradas en la fovea, un hoyo en la retina neurosensorial que es responsable de la visión central de alta resolución. Las células cónicas son menos sensibles que las células bastón. Hay en promedio alrededor de 6-7 millones de células cónicas en una retina humana normal.

Epitelio pigmentario de la retina

20 El epitelio pigmentario de la retina (RPE) es una capa pigmentada de células localizadas inmediatamente en el exterior de la retina neurosensorial. El RPE realiza una serie de funciones, incluido el transporte de nutrientes y otras sustancias a las células fotorreceptoras y la absorción de la luz dispersa para mejorar la visión.

Coroides

25 La coroides es la capa vascular situada entre el RPE y la esclerótica externa del ojo. La vasculatura de la coroides permite el suministro de oxígeno y nutrientes a la retina.

Vectores virales adenoasociados (AAV)

30 En un aspecto, la invención proporciona un vector AAV que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o un fragmento del mismo, en el que el fragmento es capaz de escindir C3b en iC3b y en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo está operativamente unido a un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE).

35 Preferiblemente, el vector AAV está en forma de una partícula de AAV.

Los métodos para preparar y modificar vectores virales y partículas de vectores virales, tales como los derivados de AAV, son bien conocidos en la técnica.

40 El vector AAV puede comprender un genoma de AAV o un fragmento o derivado del mismo.

45 Un genoma de AAV es una secuencia de polinucleótidos, que codifica funciones necesarias para la producción de una partícula de AAV. Estas funciones incluyen las que operan en el ciclo de replicación y empaquetamiento de AAV en una célula huésped, incluida la encapsidación del genoma de AAV en una partícula de AAV. Los AAV de origen natural son deficientes en la replicación y dependen de la provisión de funciones auxiliares en trans para completar un ciclo de replicación y empaquetamiento. Por consiguiente, el genoma de AAV del vector AAV de la invención es típicamente deficiente en replicación.

50 El genoma de AAV puede estar en forma monocatenaria, en sentido positivo o negativo, o alternativamente en forma bicatenaria. El uso de una forma bicatenaria permite eludir la etapa de replicación del ADN en la célula objetivo y, por lo tanto, puede acelerar la expresión del transgén.

55 El genoma de AAV puede ser de cualquier serotipo, aislado o clado de AAV derivado de forma natural. Por lo tanto, el genoma de AAV puede ser el genoma completo de un AAV de origen natural. Como es conocido por el experto en la materia, los AAV que se encuentran en la naturaleza pueden clasificarse de acuerdo con varios sistemas biológicos.

60 Comúnmente, se hace referencia a los AAV en términos de su serotipo. Un serotipo corresponde a una subespecie variante de AAV que, debido a su perfil de expresión de los antígenos de superficie de la cápside, tiene una reactividad distintiva que puede utilizarse para distinguirlo de otras subespecies variantes. Normalmente, un virus que tiene un serotipo de AAV particular no reacciona de forma cruzada eficazmente con anticuerpos neutralizantes específicos para cualquier otro serotipo de AAV.

65 Los serotipos de AAV incluyen AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 y AAV11, y también serotipos recombinantes, tales como Rec2 y Rec3, identificados recientemente a partir de cerebro de primates. Cualquiera de estos serotipos de AAV se puede utilizar en la invención. Por lo tanto, en una realización de

la invención, la partícula del vector AAV es una partícula de vector AAV, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rec2 o Rec3.

En una realización, el AAV puede ser un serotipo de AAV1, AAV2, AAV5, AAV7, AAV8 o AAV8.

En una realización, el AAV puede ser un serotipo de AAV2 o AAV8.

La proteína de la cápside puede ser una proteína de la cápside mutante tal como se divulga en el documento WO 2008/124724, que se incorpora en el presente documento como referencia.

En una realización, el vector AAV comprende una cápside de AAV8 con una mutación Y733F.

Pueden encontrarse revisiones de los serotipos de AAV en Choi et al., (2005) Curr. Gene Ther. 5: 299-310 y Wu et al., (2006) Molecular Therapy 14: 316-27. Las secuencias de genomas de AAV o de elementos de genomas de AAV que incluyen secuencias ITR, genes rep o cap para su uso en la invención pueden derivarse de los siguientes números de acceso para secuencias de genomas completos de AAV: virus 1 adenoasociado NC_002077, AF063497; Virus 2 adenoasociado NC_001401; Virus 3 adenoasociado NC_001729; Virus 3B adenoasociado NC_001863; Virus 4 adenoasociado NC_001829; Virus 5 adenoasociado Y18065, AF085716; Virus 6 adenoasociado NC_001862; AAV Aviar ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC_004828; AAV aviar Cepa DA-1 NC_006263, AY629583; AAV Bovino NC_005889, AY388617.

También se puede hacer referencia a AAV en términos de clados o clones. Esto se refiere a la relación filogenética de los AAV de origen natural, y típicamente a un grupo filogenético de AAV que se puede rastrear hasta un ancestro común, e incluye a todos sus descendientes. Además, se puede hacer referencia a los AAV en términos de un aislado específico, es decir, un aislado genético de un AAV específico que se encuentra en la naturaleza. El término aislado genético describe una población de AAV que ha sufrido una mezcla genética limitada con otros AAV de origen natural, definiendo así una población reconociblemente distinta a nivel genético.

El experto en la materia puede seleccionar un serotipo, clado, clon o aislado apropiado de AAV para su uso en la invención basándose en su conocimiento general común. Por ejemplo, se ha demostrado que la cápside de AAV5 transduce los fotorreceptores de cono de primates de manera eficiente, como lo demuestra la corrección exitosa de un defecto de visión de color heredado (Mancuso et al., (2009) Nature 461: 784-7).

El serotipo de AAV determina la especificidad del tejido de la infección (o tropismo) de un virus AAV. Por consiguiente, los serotipos de AAV preferidos para su uso en AAV administrados a pacientes de acuerdo con la invención son aquellos que tienen tropismo natural o una alta eficacia de infección de las células objetivo dentro del ojo. En una realización, los serotipos de AAV para usar en la invención son aquellos que transducen células de la retina neurosensorial, el epitelio pigmentario de la retina y/o la coroides.

Normalmente, el genoma de AAV de un serotipo, aislado o clado de AAV de origen natural comprende al menos una secuencia de repetición terminal invertida (ITR). Una secuencia de ITR actúa en cis para proporcionar un origen funcional de replicación y permite la integración y escisión del vector del genoma de una célula. En realizaciones preferidas, una o más secuencias de ITR flanquean las secuencias de nucleótidos que codifican el Factor I (o el fragmento del mismo). El genoma de AAV también comprende típicamente genes de empaquetamiento, tales como genes rep y/o cap que codifican funciones de empaquetamiento para una partícula de AAV. El gen rep codifica una o más de las proteínas Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40 o variantes de las mismas. El gen cap codifica una o más proteínas de la cápside tales como VP1, VP2 y VP3 o variantes de las mismas. Estas proteínas forman la cápside de una partícula de AAV. Las variantes de la cápside se analizan a continuación.

Un promotor estará operativamente ligado a cada uno de los genes de empaquetamiento. Los ejemplos específicos de tales promotores incluyen los promotores p5, p19 y p40 (Laughlin et al., (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 5567-5571). Por ejemplo, los promotores p5 y p19 se usan generalmente para expresar el gen rep, mientras que el promotor p40 se usa generalmente para expresar el gen cap.

Como se discutió anteriormente, el genoma de AAV usado en el vector AAV de la invención puede ser, por lo tanto, el genoma completo de un AAV de origen natural. Por ejemplo, un vector que comprende un genoma completo de AAV puede usarse para preparar un vector AAV o una partícula de vector *in vitro*. Sin embargo, aunque dicho vector puede administrarse en principio a pacientes, en la práctica esto rara vez se hará. Preferiblemente, el genoma de AAV se derivará con el fin de administrarlo a los pacientes. Tal derivatización es estándar en la técnica y la invención abarca el uso de cualquier derivado conocido de un genoma de AAV y derivados que podrían generarse aplicando técnicas conocidas en el arte. La derivación del genoma de AAV y de la cápside de AAV se revisan en Coura y Nardi (2007) Virology Journal 4: 99, y en Choi et al. y Wu et al., referenciados anteriormente.

Los derivados de un genoma de AAV incluyen cualquier forma truncada o modificada de un genoma de AAV que permitan la expresión de un transgén de un vector AAV de la invención *in vivo*. Típicamente, es posible truncar el genoma de AAV de manera significativa para incluir una secuencia viral mínima pero conservar la función anterior.

Esto se prefiere por razones de seguridad para reducir el riesgo de recombinación del vector con virus de tipo silvestre y también para evitar desencadenar una respuesta inmune celular por la presencia de proteínas génicas virales en la célula objetivo.

5 Típicamente, un derivado incluirá al menos una secuencia de repetición terminal invertida (ITR), preferiblemente más de una ITR, tal como dos ITR o más. Una o más de las ITR pueden derivarse de genomas de AAV que tienen diferentes serotipos, o puede ser una ITR quimérica o mutante. Una ITR mutante preferida es una que tiene una eliminación de un trs (sitio de resolución terminal). Esta eliminación permite la replicación continua del genoma para generar un genoma monocatenario que contiene secuencias codificantes y complementarias, es decir, un genoma de AAV autocomplementario. Esto permite evitar la replicación del ADN en la célula objetivo y, por lo tanto, acelera la expresión del transgén.

15 Una o más ITR flanquearán preferiblemente la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I (o el fragmento del mismo) en cualquier extremo. Se prefiere la inclusión de una o más ITR para ayudar a la formación de concatámeros del vector de la invención en el núcleo de una célula huésped, por ejemplo, después de la conversión de ADN del vector monocatenario en ADN bicatenario por la acción del ADN polimerasas de la célula huésped. La formación de tales concatámeros episomales protege la construcción del vector durante la vida de la célula huésped, permitiendo así la expresión prolongada del transgén *in vivo*.

20 En las realizaciones preferidas, los elementos de ITR serán las únicas secuencias retenidas del genoma nativo de AAV en el derivado. Por lo tanto, un derivado preferiblemente no incluirá los genes rep y/o cap del genoma nativo y cualquier otra secuencia del genoma nativo. Esto se prefiere por las razones descritas anteriormente y también para reducir la posibilidad de integración del vector en el genoma de la célula huésped. Además, la reducción del tamaño del genoma de AAV permite una mayor flexibilidad al incorporar otros elementos de secuencia (tal como los elementos reguladores) dentro del vector además del transgén.

30 Por lo tanto, las siguientes porciones podrían eliminarse en un derivado de la invención: una secuencia de repetición terminal invertida (ITR), los genes de replicación (rep) y de cápside (cap). Sin embargo, en algunas realizaciones, los derivados pueden incluir adicionalmente uno o más genes rep y/o cap u otras secuencias virales de un genoma de AAV. El AAV de origen natural se integra con alta frecuencia en un sitio específico del cromosoma 19 humano y muestra una frecuencia insignificante de integración aleatoria, de modo que la retención de una capacidad integradora en el vector puede tolerarse en un entorno terapéutico.

35 Cuando un derivado comprende proteínas de la cápside, es decir, VP1, VP2 y/o VP3, el derivado puede ser un derivado quimérico, barajado o de cápside modificada de uno o más AAV de origen natural. En particular, la invención abarca la provisión de secuencias de proteínas de la cápside de diferentes serotipos, clados, clones o aislados de AAV dentro del mismo vector (es decir, un vector pseudotipado).

40 Los derivados quiméricos, mezclados o de cápside modificada se seleccionarán típicamente para proporcionar una o más funcionalidades deseadas para el vector AAV. Por lo tanto, estos derivados pueden mostrar una mayor eficiencia de suministro de genes, una disminución de la inmunogenicidad (humoral o celular), un intervalo de tropismo alterado y/o un mejor direccionamiento de un tipo de célula particular en comparación con un vector AAV que comprende un genoma de AAV de origen natural, tal como el de AAV2. El aumento de la eficiencia del suministro de genes se puede lograr mediante la mejora de la unión del receptor o correceptor en la superficie celular, la internalización mejorada, el tráfico mejorado dentro de la célula y hacia el núcleo, la eliminación mejorada de la partícula viral y la conversión mejorada de un genoma monocatenario en una forma bicatenaria. El aumento de la eficiencia también puede relacionarse con un intervalo de tropismo alterado o direccionamiento de una población de células específicas, de modo que la dosis del vector no se diluya mediante la administración a tejidos en los que no se necesita.

50 Las proteínas de la cápside quimérica incluyen las generadas por recombinación entre dos o más secuencias codificantes de la cápside de serotipos de AAV de origen natural. Esto se puede realizar, por ejemplo, mediante un enfoque de rescate de marcadores en el que las secuencias no infecciosas de la cápside de un serotipo se cotransfectan con secuencias de la cápside de un serotipo diferente, y se usa la selección dirigida para seleccionar las secuencias de la cápside que tienen las propiedades deseadas. Las secuencias de la cápside de los diferentes serotipos pueden alterarse mediante recombinación homóloga dentro de la célula para producir nuevas proteínas quiméricas de la cápside.

60 Las proteínas quiméricas de la cápside también incluyen aquellas generadas mediante modificación de secuencias de proteína de la cápside para transferir dominios de proteína específicos de la cápside, bucles de superficie o residuos de aminoácidos específicos entre dos o más proteínas de la cápside, por ejemplo, entre dos o más proteínas de la cápside de diferentes serotipos.

65 Las proteínas quiméricas o transpuestas de la cápside también pueden generarse mediante mezcla de ADN o mediante PCR propensa a errores. Los genes híbridos de la cápside de AAV se pueden crear fragmentando aleatoriamente las secuencias de genes de AAV relacionados, por ejemplo, los que codifican proteínas de la cápside de múltiples serotipos diferentes y luego reensamblar posteriormente los fragmentos en una reacción de polimerasa

5 autocebante, que también puede causar cruces en regiones de homología de secuencia. Se puede cribar una biblioteca de genes híbridos de AAV creada de esta manera mezclando los genes de la cápside de varios serotipos para identificar clones virales que tengan una funcionalidad deseada. De manera similar, la PCR propensa a errores puede usarse para mutar aleatoriamente genes de la cápside de AAV para crear una biblioteca diversa de variantes que luego pueden seleccionarse para una propiedad deseada.

10 Las secuencias de los genes de la cápside también pueden modificarse genéticamente para introducir eliminaciones, sustituciones o inserciones específicas con respecto a la secuencia nativa de tipo silvestre. En particular, los genes de la cápside pueden modificarse mediante la inserción de una secuencia de una proteína o péptido no relacionado dentro de un marco de lectura abierto de una secuencia codificante de la cápside, o en el extremo terminal N y/o C de una secuencia codificante de la cápside.

15 La proteína o péptido no relacionado puede ser ventajosamente uno que actúa como ligando para un tipo de célula particular, confiriendo así una unión mejorada a una célula objetivo o mejorando la especificidad del direccionamiento del vector a una población celular particular. Un ejemplo podría incluir el uso del péptido RGD para bloquear la absorción en el epitelio pigmentario de la retina y, por lo tanto, mejorar la transducción de los tejidos retinianos circundantes (Cronin et al., (2008) ARVO Abstract: D1048). La proteína no relacionada también puede ser una que ayude a la purificación de la partícula viral como parte del proceso de producción, es decir, un epitopo o etiqueta de afinidad. El sitio de inserción se seleccionará típicamente de modo que no interfiera con otras funciones de la partícula viral, por ejemplo, internalización, tráfico de la partícula viral. El experto en la materia puede identificar sitios adecuados para la inserción basándose en su conocimiento general común. Se describen sitios particulares en Choi et al., mencionado anteriormente.

25 La invención además abarca la provisión de secuencias de un genoma de AAV en un orden y configuración diferentes a los de un genoma de AAV nativo. La invención también abarca la sustitución de una o más secuencias o genes de AAV por secuencias de otro virus o por genes quiméricos compuestos por secuencias de más de un virus. Dichos genes quiméricos pueden estar compuestos por secuencias de dos o más proteínas virales relacionadas de diferentes especies virales.

30 El vector AAV de la invención puede tomar la forma de una secuencia de nucleótidos que comprende un genoma de AAV o un derivado del mismo y una secuencia que codifica el transgén del Factor I.

35 Las partículas de AAV de la invención incluyen formas transcapsidadas en las que un genoma o derivado de AAV que tiene una ITR de un serotipo está empaquetado en la cápside de un serotipo diferente. Las partículas de AAV de la invención también incluyen formas de mosaico en las que una mezcla de proteínas de la cápside sin modificar de dos o más serotipos diferentes constituye la cápside viral. La partícula de AAV también incluye formas químicamente modificadas que portan ligandos adsorbidos a la superficie de la cápside. Por ejemplo, tales ligandos pueden incluir anticuerpos para direccionamiento a un receptor de superficie celular particular.

40 Por lo tanto, por ejemplo, las partículas de AAV de la invención incluyen aquellas con un genoma de AAV2 y proteínas de la cápside de AAV2 (AAV2/2), aquellas con un genoma de AAV2 y proteínas de la cápside de AAV5 (AAV2/5) y aquellas con un genoma de AAV2 y proteínas de la cápside de AAV8 (AAV2/8), así como aquellas con un genoma de AAV2 y proteínas de la cápside de más de un serotipo.

45 El vector AAV puede comprender múltiples copias (por ejemplo, 2, 3, etc.) de la secuencia de nucleótidos a la que se hace referencia en este documento.

Promotores y secuencias reguladoras

50 El vector AAV de la invención también puede incluir elementos que permitan la expresión del transgén del Factor I (o el fragmento del mismo) *in vitro* o *in vivo*. Estos pueden denominarse secuencias de control de la expresión. Por lo tanto, el vector AAV típicamente comprende secuencias de control de la expresión (por ejemplo, que comprenden una secuencia promotora) unidas operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el transgén.

55 Se puede usar cualquier promotor adecuado, cuya selección puede realizar fácilmente el experto en la materia. La secuencia promotora puede ser constitutivamente activa (es decir, operativa en cualquier ambiente de la célula huésped) o, alternativamente, puede ser activa solo en un entorno específico de la célula huésped, permitiendo así la expresión dirigida del transgén en un tipo de célula particular (por ejemplo, un promotor específico de tejido). El promotor puede mostrar expresión inducible en respuesta a la presencia de otro factor, por ejemplo, un factor presente en una célula huésped. En cualquier caso, cuando el vector se administra para terapia, se prefiere que el promotor sea funcional en el ambiente de la célula objetivo.

60 En algunas realizaciones, se prefiere que el promotor muestre expresión específica de células retinianas para permitir que el transgén solo se exprese en poblaciones de células retinianas. Por lo tanto, la expresión del promotor puede ser específica de células de la retina, por ejemplo, confinada sólo a las células de la retina neurosensorial y del epitelio pigmentario de la retina.

Los promotores preferidos, que no son específicos de células de la retina, incluyen el promotor de beta-actina de pollo (CBA), opcionalmente en combinación con un elemento potenciador del citomegalovirus (CMV). Un ejemplo de promotor para usar en la invención es un promotor CAG, por ejemplo, el promotor usado en el casete de expresión rAVE (GeneDetect.com). Otro ejemplo de promotor para usar en la invención tiene la secuencia:

```

ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTG
GAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG
ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTG
GCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTC
CCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTGTGCAGCGATGG
GGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCG
GAGAGGTGCGGCGGCAGCAATCAGAGCGGCGGCTCCGAAAGTTTCCCTTTATGGCGAGGCGGCGGCGG
CGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGGCGGGGCGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCCTCGCCCCGTGCCCC
GCTCCGCCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGCTTACTCCACAGGTGAGCGGGCG
GGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTG
CGTAAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGCTGTCCCGGGGG
GACGGCTGCCTTCCGGGGGGACGGGCGAGGGGGGTTCCGCTTCTGGCGTGTGACCGCGGCTCTAGAG
CCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCCTTCTTTTCTTCTACAGCTCCTGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCT
GTCTCATCATTTTGGCAAAGAATT
    
```

(SEQ ID NO: 5)

En una realización, el vector AAV comprende un promotor con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5. En otra realización, el vector AAV comprende un promotor con una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 5, en la que la secuencia de nucleótidos retiene sustancialmente la actividad funcional del promotor representado por la SEQ ID NO: 5.

Los ejemplos de promotores basados en secuencias humanas que inducirían la expresión génica específica de la retina incluyen rodopsina quinasa para bastones y conos (Allocca et al., (2007) J. Virol. 81: 11372-80), PR2.1 solo para conos (Mancuso et al., (2009) Nature 461: 784-7) y/o RPE65 (Bainbridge et al., (2008) N. Engl. J. Med. 358: 2231-9) o VMD2 (Esumi et al., (2004) J. Biol. Chem. 279: 19064-73) para el epitelio pigmentario de la retina.

El vector AAV de la invención también puede comprender una o más secuencias reguladoras adicionales que pueden actuar pre-transcripcionalmente o post-transcripcionalmente. La secuencia reguladora puede ser parte del locus transgénico nativo o puede ser una secuencia reguladora heteróloga. El vector AAV de la invención puede comprender porciones de 5'-UTR o 3'-UTR del transcrito del transgén nativo.

Las secuencias reguladoras son cualquier secuencia que facilite la expresión del transgén, es decir, actúe para aumentar la expresión de un transcrito, mejore la exportación nuclear de ARNm o mejore su estabilidad. Dichas secuencias reguladoras incluyen, por ejemplo, elementos potenciadores, elementos reguladores postranscripcionales y sitios de poliadenilación. Un sitio de poliadenilación preferido es la señal poli-A de la hormona de crecimiento bovina que puede ser como se muestra a continuación:

```

TCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCGTGCCTTCC
TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGA
GTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTTGGGAAGACAATAG
CAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGG
    
```

(SEQ ID NO: 6)

En una realización, el vector AAV comprende un sitio de poliadenilación con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6. En otra realización, el vector AAV comprende un sitio de poliadenilación con una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 6, en la que la secuencia de nucleótidos retiene sustancialmente la actividad funcional del sitio de poliadenilación representado por la SEQ ID NO: 6.

En el contexto del vector AAV de la invención, tales secuencias reguladoras actuarán en forma cis. Sin embargo, la invención también abarca el uso de secuencias reguladoras que actúan en forma trans ubicadas en construcciones genéticas adicionales.

Un elemento regulador postranscripcional para uso en un vector AAV de la invención es el elemento regulador postranscripcional de la hepatitis de la marmota (WPRE) o una variante del mismo. A continuación se muestra un ejemplo de secuencia del WPRE:

ATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCT
 ATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCCTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCC
 TTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTGAGGCAACGTGGCGTGGTGT
 GCACGTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGAC
 TTTGCTTTCCCTTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGG
 GCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCTTTTCTTGGCTGCTCG
 CCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGA
 CCTTCCCTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCTCTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGT
 CGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCGC

(SEQ ID NO: 7)

5 En una realización, el vector AAV comprende un elemento regulador postranscripcional con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7. En otra realización, el vector AAV comprende un elemento regulador postranscripcional con una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la SEQ ID NO: 7, en la que la secuencia de nucleótidos retiene sustancialmente la actividad funcional del elemento regulador postranscripcional representado por la SEQ ID NO: 7.

10 La invención abarca el uso de cualquier secuencia variante del WPRE que aumenta la expresión del transgén en comparación con un vector AAV sin un WPRE. Preferiblemente, las secuencias variantes presentan al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 7 en toda su secuencia, más preferiblemente 75%, 80%, 85%, 90% y más preferiblemente al menos 95%, 96% 97%, 98% o 99% de identidad con la SEQ ID NO: 7 en toda su secuencia.

15 Otra secuencia reguladora que puede usarse en un vector AAV de la invención es una región de unión a la estructura (SAR). El experto en la materia puede seleccionar fácilmente secuencias reguladoras adicionales.

Método de administración

20 En una realización preferida, el vector AAV se administra por vía intraocular.

El término "intraocular" se refiere al interior del ojo, por lo que la administración intraocular se refiere a la administración en el interior del ojo de un sujeto.

25 En una realización de la invención, el vector AAV se administra al ojo de un sujeto mediante inyección subretiniana, retiniana directa, supracoroidea o intravítrea. En una realización, dicha administración la realiza un robot.

30 El volumen de la composición del medicamento inyectado puede ser, por ejemplo, aproximadamente 10-500 µL, por ejemplo aproximadamente 50-500, 100-500, 200-500, 300-500, 400-500, 50-250, 100-250, 200-250 o 50-150 µL. El volumen puede ser, por ejemplo, aproximadamente 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 µL. Preferiblemente, el volumen de la composición del medicamento inyectado es de 100 µL.

El experto en la materia estará familiarizado y será muy capaz de realizar inyecciones subretinianas, retinianas directas, supracoroideas o intravítreas individuales.

35 Preferiblemente, el vector AAV se administra mediante inyección subretiniana.

En una realización, el vector AAV o la composición farmacéutica que comprende el mismo se administra no más de una vez, o no más de dos veces, durante la vida de un sujeto.

40 Inyección subretiniana

Las inyecciones subretinianas son inyecciones en el espacio subretiniano, es decir, debajo de la retina neurosensorial. Durante una inyección subretiniana, el material inyectado se dirige y crea un espacio entre la célula fotorreceptora y las capas del epitelio pigmentario de la retina (RPE).

45 Cuando la inyección se realiza a través de una pequeña retinotomía, se puede crear un desprendimiento de retina. La capa elevada y desprendida de la retina que es generada por el material inyectado se conoce como una "ampolla".

50 El orificio creado por la inyección subretiniana debe ser lo suficientemente pequeño como para que la solución inyectada no refluya significativamente hacia la cavidad vítrea después de la administración. Tal reflujó sería particularmente problemático cuando se inyecta un medicamento, porque los efectos del medicamento se alejarían de la zona objetivo. Preferiblemente, la inyección crea un punto de entrada autosellante en la retina neurosensorial, es decir, una vez que se retira la aguja de inyección, el orificio creado por la aguja se vuelve a sellar de manera que muy poco o prácticamente ningún material inyectado se libera a través del orificio.

Para facilitar este proceso, están disponibles comercialmente agujas de inyección subretinianas especializadas (por ejemplo, aguja de inyección subretiniana de teflón DORC 41G, Dutch Ophthalmic Research Centre International BV, Zuidland, Países Bajos). Son agujas diseñadas para realizar inyecciones subretinianas.

5 A menos que se produzca daño en la retina durante la inyección, y siempre que se utilice una aguja suficientemente pequeña, sustancialmente todo el material inyectado permanece localizado entre la retina neurosensorial desprendida y el RPE en el sitio del desprendimiento de retina localizado (es decir, no reflujo en la cavidad vítrea). De hecho, la persistencia típica de la ampolla durante un período de tiempo corto indica que generalmente hay poco escape del material inyectado en el vítreo. La ampolla puede disiparse durante un período de tiempo más largo a medida que se absorbe el material inyectado.

Las visualizaciones del ojo, en particular de la retina, por ejemplo usando tomografía de coherencia óptica, pueden realizarse antes de la operación.

15 El volumen de la composición de medicamento inyectada puede ser, por ejemplo, aproximadamente 10-500 μL , por ejemplo aproximadamente 50-500, 100-500, 200-500, 300-500, 400-500, 50-250, 100-250, 200-250 o 50-150 μL . El volumen puede ser, por ejemplo, aproximadamente 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 μL . Preferiblemente, el volumen de la composición de medicamento inyectada es de 100 μL . Los volúmenes más grandes pueden aumentar el riesgo de estirar la retina, mientras que los volúmenes más pequeños pueden ser difíciles de observar.

Inyección subretiniana de dos etapas

25 El vector de la invención puede administrarse con mayor precisión y seguridad mediante el uso de un método de dos etapas en el que se crea un desprendimiento de retina localizado mediante la inyección subretiniana de una primera solución. La primera solución no comprende el vector. A continuación, se usa una segunda inyección subretiniana para administrar el medicamento que comprende el vector en el líquido subretiniano de la ampolla creada por la primera inyección subretiniana. Debido a que la inyección que administra el medicamento no se usa para separar la retina, se puede inyectar un volumen específico de solución en esta segunda etapa.

En una realización de la invención, la inyección subretiniana del vector comprende las etapas de:

(a) administrar una solución al sujeto mediante inyección subretiniana en una cantidad eficaz para separar al menos parcialmente la retina para formar una ampolla subretiniana, en la que la solución no comprende el vector; y

(b) administrar una composición de medicamento mediante inyección subretiniana en la ampolla formada por la etapa (a), en la que el medicamento comprende el vector.

40 El volumen de solución inyectado en la etapa (a) para separar al menos parcialmente la retina puede ser, por ejemplo, aproximadamente 10-1000 μL , por ejemplo aproximadamente 50-1000, 100-1000, 250-1000, 500-1000, 10-500, 50-500, 100-500, 250-500 μL . El volumen puede ser, por ejemplo, aproximadamente 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 μL .

45 El volumen de la composición del medicamento inyectado en la etapa (b) puede ser, por ejemplo, aproximadamente 10-500 μL , por ejemplo aproximadamente 50-500, 100-500, 200-500, 300-500, 400-500, 50-250, 100-250, 200-250 o 50-150 μL . El volumen puede ser, por ejemplo, aproximadamente 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 μL . Preferiblemente, el volumen de la composición del medicamento inyectado en la etapa (b) es de 100 μL . Los volúmenes más grandes pueden aumentar el riesgo de estirar la retina, mientras que los volúmenes más pequeños pueden ser difíciles de observar.

50 La solución que no comprende el medicamento (es decir, la "solución" de la etapa (a)) se puede formular de manera similar a la solución que sí comprende el medicamento, como se describe a continuación. Una solución preferida que no comprende el medicamento es solución salina equilibrada (BSS) o una solución tampón similar adaptada al pH y la osmolalidad del espacio subretiniano.

Visualización de la retina durante la cirugía

55 En determinadas circunstancias, por ejemplo durante las degeneraciones retinianas en etapa terminal, es difícil identificar la retina porque es delgada, transparente y difícil de observar contra el epitelio roto y muy pigmentado sobre el que se asienta. El uso de un tinte vital azul (por ejemplo, Brilliant Peel®, Geuder; MembraneBlue-Dual®, Dorc) puede facilitar la identificación del orificio retiniano realizado para el procedimiento de desprendimiento de retina (es decir, la etapa (a) en el método de inyección subretiniana de dos etapas de la invención) para que el medicamento se pueda administrar a través del mismo orificio sin riesgo de reflujo de regreso a la cavidad vítrea.

65 El uso del colorante vital azul también identifica cualquier región de la retina en la que hay una membrana limitante interna engrosada o una membrana epirretiniana, ya que la inyección a través de cualquiera de estas estructuras

dificultaría el acceso limpio al espacio subretiniano. Además, la contracción de cualquiera de estas estructuras en el período postoperatorio inmediato podría provocar el estiramiento del orificio de entrada de la retina, lo que podría provocar el reflujo del medicamento hacia la cavidad vítrea.

5 Inyección supracoroidea

El vector de la invención se puede administrar al espacio supracoroideo usando un enfoque ab externo que utiliza un microcatéter (véase, por ejemplo, Peden et al., (2011) PLoS One 6 (2): e17140). En este método se realiza una peritomía conjuntival limbal para exponer la esclerótica desnuda, seguida de esclerotomía para exponer la coroides desnuda. Un microcatéter (tal como el iTrack 250A de iScience Interventional, opcionalmente conectado a un sistema de iluminación tal como el sistema de microiluminación basado en diodos láser iLumin (iScience Interventional)) se introduce en el espacio supracoroideo y avanza posteriormente hacia el disco óptico. Tras la manipulación de la punta del microcatéter en la posición deseada, la inyección del vector forma una ampolla dentro de la retina y la coroides.

15 Por lo tanto, en una realización, el vector se administra por vía supracoroidea mediante un método que comprende (i) la introducción de un microcatéter en el espacio supracoroideo; (ii) hacer avanzar el microcatéter dentro de dicho espacio hasta que la punta esté en la proximidad de la región afectada de la retina; y (iii) inyectar el vector desde la punta del microcatéter para crear una ampolla.

20 En una realización, los procedimientos de administración anteriores se llevan a cabo directamente por un robot.

Composiciones farmacéuticas y soluciones inyectadas

25 Los medicamentos, por ejemplo los vectores AAV, de la invención se pueden formular en composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden comprender, además del medicamento, un vehículo, diluyente, excipiente, tampón, estabilizador u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del ingrediente activo. El experto en la materia puede determinar la naturaleza precisa del vehículo u otro material de acuerdo con la vía de administración, por ejemplo, inyección subretiniana, retiniana directa, supracoroidea o intravítrea.

30 La composición farmacéutica está típicamente en forma líquida. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente incluyen un vehículo líquido tal como agua, derivado de petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Se pueden incluir solución salina fisiológica, cloruro de magnesio, dextrosa u otra solución de sacarido, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. En algunos casos, se puede utilizar un tensioactivo, tal como ácido plurónico (PF68) al 0,001%.

35 Para la inyección en el lugar de la aflicción, el ingrediente activo puede estar en forma de una solución acuosa libre de pirógenos y que tenga un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. El experto en la materia puede preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de lactato de Ringer. Se pueden incluir conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos según se requiera.

40 Para la liberación retardada, el medicamento puede incluirse en una composición farmacéutica que se formula para una liberación lenta, tal como en microcápsulas formadas a partir de polímeros biocompatibles o en sistemas portadores liposomales de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

Método de tratamiento

45 Debe apreciarse que todas las referencias en el presente documento al tratamiento incluyen tratamiento curativo, paliativo y profiláctico; aunque en el contexto de la divulgación, las referencias a la prevención se asocian más comúnmente con el tratamiento profiláctico. El tratamiento también puede incluir detener la progresión de la gravedad de una enfermedad.

50 Se prefiere el tratamiento de mamíferos, particularmente humanos. Sin embargo, tanto los tratamientos humanos como los veterinarios están dentro del alcance de la divulgación.

Variantes, derivadas, análogos, homólogos y fragmentos

55 Además de las proteínas y nucleótidos específicos mencionados en el presente documento, también se describe en el presente documento el uso de variantes, derivados, análogos, homólogos y fragmentos de los mismos.

60 En el contexto de la divulgación, una variante de cualquier secuencia dada es una secuencia en la que la secuencia específica de residuos (ya sean residuos de aminoácidos o ácidos nucleicos) se ha modificado de tal manera que el polipéptido o polinucleótido en cuestión conserva sustancialmente su función. Se puede obtener una secuencia variante por adición, eliminación, sustitución, modificación, reemplazo y/o variación de al menos un residuo presente en la proteína de origen natural.

5 El término "derivado" como se usa en este documento, en relación con proteínas o polipéptidos descritos en este documento incluye cualquier sustitución, variación, modificación, reemplazo, eliminación y/o adición de uno (o más) residuos de aminoácidos de la secuencia que proporciona que la proteína o polipéptido resultante retenga sustancialmente al menos una de sus funciones endógenas.

10 El término "análogo" como se usa en este documento, en relación con polipéptidos o polinucleótidos incluye cualquier mimético, es decir, un compuesto químico que posee al menos una de las funciones endógenas de los polipéptidos o polinucleótidos que imita.

Normalmente, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, de 1, 2 o 3 a 10 o 20 sustituciones siempre que la secuencia modificada conserve sustancialmente la actividad o capacidad requerida. Las sustituciones de aminoácidos pueden incluir el uso de análogos de origen no natural.

15 Las proteínas utilizadas en la invención también pueden tener eliminaciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una proteína funcionalmente equivalente. Pueden realizarse sustituciones deliberadas de aminoácidos sobre la base de similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos siempre que se mantenga la función endógena. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen asparagina, glutamina, serina, treonina y tirosina.

25 Se pueden realizar sustituciones conservadoras, por ejemplo, de acuerdo con la siguiente tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna pueden ser sustituidos entre sí:

ALIFÁTICO	No polar	G A P I L V
	Polar - no cargado	C S T M N Q
	Polar - cargado	D E K R H
		F W Y
AROMÁTICO		

30 El término "homólogo", como se usa en este documento, significa una entidad que tiene cierta homología con la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre y la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre. El término "homología" puede equipararse con "identidad".

35 Una secuencia homóloga puede incluir una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% idéntica, preferiblemente al menos 95% o 97% o 99% idéntica a la secuencia objetivo. Normalmente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos, etc. que la secuencia de aminoácidos objetivo. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

40 Una secuencia homóloga puede incluir una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o 90% idéntica, preferiblemente al menos 95% o 97% o 99% idéntica a la secuencia objetivo. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud, en el contexto de la invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

45 Preferiblemente, la referencia a una secuencia que tiene un porcentaje de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO detalladas en este documento se refiere a una secuencia que tiene el porcentaje de identidad indicado en toda la longitud de la SEQ ID NO a la que se hace referencia.

50 Las comparaciones de homología se pueden realizar visualmente o, más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles comercialmente pueden calcular el porcentaje de homología o identidad entre dos o más secuencias.

55 El porcentaje de homología se puede calcular sobre secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo a la vez. Esto se llama alineación "sin huecos". Normalmente, tales alineaciones sin huecos se realizan solo en un número relativamente corto de residuos.

Aunque este es un método muy simple y consistente, no toma en consideración que, por ejemplo, en un par de secuencias idénticas, una inserción o eliminación en la secuencia de nucleótidos puede causar que los siguientes

codones se eliminan de la alineación, lo que potencialmente da como resultado una gran reducción en el porcentaje de homología cuando se realiza una alineación global. En consecuencia, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta posibles inserciones y eliminaciones sin penalizar indebidamente la puntuación de homología general. Esto se logra insertando "huecos" en la alineación de la secuencia para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones por huecos" a cada hueco que se produce en el alineamiento de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencia con el menor número de huecos posible, que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas, obtendrán una puntuación más alta que una con muchos huecos. Los "costes de huecos afines" se utilizan típicamente para cargar un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización menor por cada residuo subsiguiente en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más utilizado. Las penalizaciones por gran cantidad de huecos desde luego producirán, alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por huecos. Sin embargo, se prefiere usar los valores predeterminados cuando se usa dicho software para comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se usa el paquete GCG Wisconsin Bestfit, la penalización por hueco predeterminada para las secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

Por lo tanto, el cálculo del porcentaje máximo de homología requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, teniendo en cuenta las penalizaciones por huecos. Un programa informático adecuado para llevar a cabo tal alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, EE. UU.; Devereux et al., (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 387). Ejemplos de otro software que puede realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete BLAST (véase Ausubel et al., (1999) *ibidem* – Cap. 18), FASTA (Atschul et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 403-410) y el conjunto de herramientas de comparación GENWORKS. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsquedas en línea y fuera de línea (véase Ausubel et al., (1999) *ibidem*, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere utilizar el programa GCG Bestfit. También está disponible otra herramienta, denominada Secuencias BLAST 2 para comparar secuencias de proteínas y nucleótidos (véase *FEMS Microbiol. Lett.* (1999) 174: 247-50; *FEMS Microbiol. Lett.* (1999) 177: 187-8).

Aunque el porcentaje de homología final se puede medir en términos de identidad, el proceso de alineación en sí mismo no se basa típicamente en una comparación de pares de todo o nada. En cambio, generalmente se usa una matriz de puntuación de similitud escalada que asigna puntuaciones a cada comparación por pares en función de la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de una matriz de este tipo comúnmente utilizada es la matriz BLOSUM62, la matriz predeterminada para el conjunto de programas BLAST. Los programas de GCG Wisconsin generalmente usan los valores públicos predeterminados o una tabla de comparación de símbolos personalizada, si se proporciona (consulte el manual del usuario para obtener más detalles). Para algunas aplicaciones, se prefiere utilizar los valores públicos predeterminados para el paquete GCG o, en el caso de otro software, la matriz predeterminada, tal como BLOSUM62.

Una vez que el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el porcentaje de homología, preferiblemente el porcentaje de identidad de secuencia. El software normalmente hace esto como parte de la comparación de secuencia y genera un resultado numérico.

Los "fragmentos" del Factor I o Factor H de longitud completa también son variantes y el término se refiere típicamente a una región seleccionada del polipéptido o polinucleótido que es de interés funcional o, por ejemplo, en un ensayo. Por lo tanto, "fragmento" se refiere a una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos que es una porción de un polipéptido o polinucleótido de longitud completa.

Tales variantes se pueden preparar usando técnicas estándar de ADN recombinante tales como mutagénesis dirigida al sitio. Cuando se van a realizar inserciones, se puede preparar ADN sintético que codifique la inserción junto con las regiones flanqueantes 5' y 3' correspondientes a la secuencia de origen natural a cada lado del sitio de inserción. Las regiones flanqueantes contendrán sitios de restricción convenientes correspondientes a sitios en la secuencia natural de modo que la secuencia pueda cortarse con la enzima o enzimas apropiadas y el ADN sintético ligado en el corte. A continuación, el ADN se expresa de acuerdo con la invención para producir la proteína codificada. Estos métodos son solo ilustrativos de las numerosas técnicas estándar conocidas en el arte para la manipulación de secuencias de ADN y también pueden usarse otras técnicas conocidas.

Se describirán ahora varias características y realizaciones preferidas de la presente invención a modo de ejemplos no limitantes.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, bioquímica, biología molecular, microbiología e inmunología, que están dentro de las capacidades de un experto en la materia. Estas técnicas se explican en la literatura. Véase, por ejemplo, Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al. (1995 y suplementos periódicos) *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulos 9, 13 y 16, John Wiley & Sons; Roe, B., Crabtree, J. y Kahn, A. (1996) *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley &

Sons; Polak, J.M. y McGee, J.O'D. (1990) *In Situ Hybridization: Principles and Practice*, Oxford University Press; Gait, M.J. (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; y Lilley, D.M. y Dahlberg, J.E. (1992) *Methods in Enzymology: DNA Structures Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA*, Academic Press. Cada uno de estos textos generales se incorpora en el presente documento como referencia.

5

Ejemplos

Ejemplo 1

10 Clonación de ADNc de CFI humano y generación del casete de expresión CBA-CFI-WPRE, construcción de pAAV-CBA-CFI-WPRE-bGHpA y empaquetamiento del virus AAV-CFI.

15 El ADNc de la variante de secuencia de CFI humana más común se descargó del GenBank, número de acceso NM_000204.4. El ADNc tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 2 y se ordenó como fragmentos génicos gBlocks® de Integrated DNA Technologies. También se ordenó una segunda construcción de CFI en la que la secuencia de ADNc del gen de CFI era de codón optimizado para la expresión en células humanas. La secuencia de codón optimizado ("CFIco") tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 8 y se solicitó a GeneWiz (CFIco en el plásmido pUC57).

20 Estas secuencias de ADNc se insertaron en un plásmido cis pAAV, denominado pAM. pAM es un plásmido de alto número de copias derivado originalmente de pBR322, pero incluye repeticiones terminales invertidas izquierda y derecha de AAV-2 estabilizadas que flanquean el casete de expresión de elección. Para el vector AAV-CFI y AAV-CFIco, se usó un promotor CBA/CAG modificado (beta-actina de pollo con potenciador de CMV; llamado "CBA" en el presente documento) para impulsar la expresión de CFI y CFIco y una secuencia de WPRE modificada y se proporcionaron poliA de bGH 3' al ADNc. Los dos plásmidos se denominaron pAAV2.CBA-hCFI-WPRE-bGH, (pAAV-CFI) y pAAV2.CBA-hCFIco-WPRE-bGH, (pAAV-CFIco).

25 La Figura 2 muestra un gel de agarosa de digestiones de restricción de CFI y CFIco. La banda de 1752 pb de CFI se cortó y se clonó en la cadena principal de pAAV-CBA-WPRE-bGHpA.

30 Comparación de los niveles de expresión de CFI de pAAV.CFI con pAAV.CFIco, cotransfección de la línea celular ARPE-19 con pAAV-CFI o pAAV.CFIco y pCMV.GFP, e inmunotransferencia de CFI

35 ARPE-19 (ATCC® CRL-2302^{MR}) es una línea celular de epitelio de pigmento retiniano (RPE) que surge espontáneamente derivada en 1986 por Amy Aotaki-Keen de los ojos normales de un hombre de 19 años que murió por un trauma de cabeza en un accidente automovilístico. Estas células forman monocapas adherentes estables, que exhiben polarización morfológica cuando se colocan sobre filtros Transwell-COL recubiertos con laminina en medio con una concentración baja en suero. Las células ARPE-19 se adquirieron de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células se cultivaron en DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) suplementado con suero bovino fetal al 10% inactivado por calor (Gibco), L-glutamina 200 mM al 1% (Sigma Aldrich) y penicilina-estreptomina al 1% (Sigma Aldrich, 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomina/mL).

40 La cotransfección de ARPE-19 se realizó usando Lipofectamine LTX (Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se cotransfectaron 0,5 µg de pAAV-CFI o pAAV.CFIco con 0,5 µg de pCMV.GFP (Plasmid Factory). La cotransfección de un pAAV-CBA-WPRE-bGHpA (pAAV [sin casete transgénico]) sirvió como control negativo. 24 horas después de la transfección, las células se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,2, Gibco^{MR}) y se cultivaron en medio de crecimiento sin suero durante 72 horas. Se tomó el sobrenadante, se aclaró por centrifugación y se almacenó a -80 °C. Las células ARPE-19 se separaron con TrypLE Express (Gibco) y se contaron para asegurar un número igual de células por pozo. El sedimento se congeló a -20 °C durante 30 minutos. Se añadió tampón de lisis 1xRIPA (Merck Millipore) suplementado con cóctel inhibidor de proteasa sin EDTA completo^{MR} (Roche) al sedimento y las células se rompieron mediante sonicación. La proteína insoluble se centrifugó y el sobrenadante (= lisado) se almacenó a -80 °C.

45 La inmunotransferencia de CFI se realizó cargando 30 µL de sobrenadante sin diluir en tampón Laemmli 4x (Tris-HCl 250 mM (pH 6,8), SDS al 8%, glicerol al 40% y azul de bromofenol al 0,02%) y separación de proteínas en un gel de poliacrilamida prefabricado al 10% (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad) mediante transferencia semiseca, después de lo cual la membrana se bloqueó en tampón de bloqueo (1xTBS pH 8 [Sigma], Tween-20 al 0,05% y leche desnatada en polvo seca al 5% [Marvel]). Se detectó CFI con un OX21 (Tabla 1) y un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Tabla 1) diluido en tampón de bloqueo. Las bandas de proteínas se visualizaron usando el sustrato ECL Clarity Western (Bio-Rad) y se analizaron con un sistema de imágenes Odyssey® Fc. La inmunotransferencia de GFP se realizó cargando 5 µL de sobrenadante sin diluir en tampón Laemmli 4x suplementado con 50 µL/mL de β-mercaptoetanol. La inmunotransferencia se realizó como se describió anteriormente. Se detectó GFP con un anticuerpo anti-GFP Turbo (Tabla 1) y un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Tabla 1).

65 Tabla 1. Anticuerpos primarios y secundarios usados para inmunotransferencia o inmunoprecipitación

Nombre/objetivo	Clase y huésped	Proveedor	Dilución
OX21/CFI humano	Monoclonal, ratón	Thermo Fisher Scientific	1:500-1000
GFP Turbo	Policlonal, conejo	Thermo Fisher Scientific	1:5000
Factor 1 anti-humano	Antisuero, cabra	Comptech	1:1000-5000
Anti-actina β	Monoclonal, ratón	Abcam	1:20000
Clon 9/C3g* humano	Monoclonal, rata	Hycult	0,5 μ g/mL
Anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP	Policlonal, burro	Abcam	1:2500-5000
Anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con HRP	Policlonal, burro	Abcam	1:5000
Anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado con HRP	Policlonal, conejo	Sigma	1:5000
Extravidina-HRP	/	Sigma	1:5000

* El anticuerpo del clon 9 se biotiniló usando NHS-LS-LC-Biotina EZ-Link^{MR} (Thermo Fisher Scientific)

La Figura 3 muestra la inmunotransferencia de CFI (Figura 3A) y de GFP (Figura 3B). 3A: CFI aparece como una banda de 70 kDa (no reducida) y se expresó a velocidades iguales después de la transfección de ARPE-19 con pAAV.CFI o pAAV.CFIco. No se expresó CFI después de la transfección con pAAV. Se utilizó suero humano normal al 10% (NHS) como control positivo para la inmunotransferencia de CFI. 3B: La eficacia de la transfección se analizó mediante cotransfección de células ARPE-19 con pCMV.GFP. La GFP aparece como una banda de 30 kDa y la inmunotransferencia confirmó que las células se han transfectado con eficiencias similares.

Preparación de AAV.CFI y AAV.CFIco.

El virus AAV2 se preparó mediante doble transfección de líneas celulares HEK-293 (ATCC® CRL-1573^{MR}) o HEK-293T (ATCC® CRL-3216^{MR}) (ambas adherentes) con pAAV.CFI o pAAV.CFIco y pDG (Plasmid Factory) que proporciona secuencias auxiliares adenovirales y secuencias de empaquetamiento (Rep/Cap). Se cultivaron células HEK-293 y HEK-293T en DMEM (Sigma) suplementado con suero bovino fetal al 10% inactivado por calor (Gibco), L-glutamina 200 mM al 1% (Sigma Aldrich) y penicilina-estreptomicina al 1% (Sigma Aldrich, 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomina/mL). Las células se recogieron después de 72 horas y se lisaron para purificar las partículas de virus. Las partículas de AAV se purificaron en un gradiente de iodixanol y se recuperaron de la fracción al 40%. El virus se concentró en unidades de filtro centrífugo Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) y se almacenó en alícuotas a -80 °C. La pureza del virus se evaluó mediante SDS PAGE y el título se determinó mediante qPCR.

Análisis de expresión *in vitro* de AAV.CFI, AAV.CFIco y AAV.GFP, transducción de líneas celulares HEK-293 y ARPE-19, inmunotransferencia de sobrenadante de cultivo de tejidos para analizar la expresión de CFI

Se transdujeron líneas celulares HEK-293 ("293") y ARPE-19 confluentes al 70% con AAV.CFI, AAV.CFIco y AAV.GFP con una multiplicidad de infección (MOI) de 1×10^4 en medio de crecimiento normal suplementado con únicamente suero bovino fetal al 1% inactivado por calor. Después de 7 días, se recogió el sobrenadante y se aclaró mediante centrifugación. El sobrenadante se almacenó en alícuotas a -80 °C.

La inmunotransferencia se realizó como se describió anteriormente y se mezclaron 30 μ L de sobrenadante con tampón Laemmli 4x y se cargó en un gel de poliacrilamida prefabricado al 10%. Se detectó CFI con OX21 (Tabla 1) y anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Tabla 1) diluido en tampón de bloqueo (cuando el sobrenadante se cargó en condiciones no reductoras) o un antisuero para CFI humano (Tabla 1) y anticuerpo anti-IgG de cabra (molécula completa) conjugado con peroxidasa (Tabla 1) (cuando se cargó el sobrenadante en condiciones reductoras).

La Figura 4 muestra la inmunotransferencia de CFI en el sobrenadante de líneas celulares HEK-293 y ARPE-19 transducidas con virus. 4A: Se cargó el sobrenadante en condiciones no reductoras y se detectó CFI con un anticuerpo monoclonal de ratón para CFI humano (OX21, Thermo Fisher Scientific) y un anticuerpo de burro anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Abcam). CFI y CFIco se expresaron en ambas líneas celulares. La transducción de líneas celulares con AAV.GFP sirvió como control negativo, mientras que 0,5 μ g de CFI humano plasmático purificado (denominado en este documento "CFIpl") (Comptech) sirvió como control positivo. 4B: El sobrenadante se cargó en condiciones reductoras y el CFI se detectó con un anticuerpo de cabra antisuero contra CFI humano (Comptech) y anticuerpo de conejo anti-IgG de cabra (molécula completa) conjugado con peroxidasa (Sigma). El CFI apareció a 80 kDa (proenzima), 50 kDa (procesado; cadena pesada) y 35 kDa (procesado; cadena ligera). AAV.GFP sirvió como control negativo mientras que 0,5 μ g de CFI humano plasmático purificado (Comptech) y suero humano normal al 10% (denominado "NHS" en este documento) sirvieron como control positivo. CFI y CFIco se expresaron en ambas líneas celulares.

Análisis cualitativo de la expresión de CFI, ensayo de escisión de C3b para medir la actividad funcional

Para el análisis cualitativo, se inmunoprecipitó CFI usando el kit de coimmunoprecipitación (Co-IP) de Pierce (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se incubaron 30 μ g de anticuerpo monoclonal purificado

por afinidad con CFI humano (OX21, Thermo Fisher Scientific) durante 2 horas a temperatura ambiente con 25 μ L de resina de acoplamiento AminoLink Plus. Se incubó el sobrenadante de células transducidas con HEK-293 o ARPE-19 con la resina preparada durante la noche a 4 °C. Al día siguiente, la resina se lavó varias veces utilizando el tampón de lisis/lavado IP proporcionado. El CFI unido se eluyó con el tampón de elución del kit (glicina 0,1 M, pH 2,7) y se neutralizó inmediatamente con Tris 1 M, pH 9,5. La inmunoprecipitación de CFI se evaluó midiendo la absorbancia a 280 nm y mediante análisis SDS PAGE. El CFI se utilizó directamente en un ensayo de escisión de C3b o se almacenó en alícuotas a -80 °C.

En un ensayo de escisión de C3b, 1 mg de C3b plasmático purificado se incubó durante 1 hora a 37 °C con 0,5 μ g de Factor H de complemento (CFH) plasmático purificado y Factor I de complemento plasmático purificado (CFIpl) (todas las proteínas plasmáticas purificadas, se adquirieron a través de Comptech), sobrenadante de cultivo celular de células transducidas con AAV.CFI o CFI/CFIco inmunoprecipitado. Se agregó tampón Laemmli 4x con β -mercapto-etanol para detener la reacción. Las muestras se diluyeron y cargaron en un gel SDS PAGE de poliacrilamida al 10% prefabricado (Bio-Rad). Después de la transferencia a una membrana de PVDF (Bio-Rad) y el bloqueo en tampón de bloqueo (1xTBS pH 8 [Sigma]/Tween-20 al 0,05% y leche en polvo desnatada seca al 5% [Marvel]), se detectó la escisión de C3b con el clon 9 biotinilado (Tabla 1) y extravidina conjugada con HRP (Tabla 1). Este anticuerpo reacciona con un epítipo en C3g y sobre un SDS PAGE reductor reconoce la cadena α de C3, la cadena α' de C3b, la cadena C3 α' 1 de iC3b y C3dg. Por lo tanto, se puede utilizar para analizar la degradación de C3b por CFI. CFH sirve como cofactor para la degradación de C3b y debido a que el ensayo se realiza con una fuerza iónica baja, también sirve como un cofactor para la segunda escisión de iC3b a C3dg. El tampón usado fue el "tampón de elución" de el kit de coimmunoprecipitación (Co-IP) de Pierce (Thermo Fisher Scientific) neutralizado con Tris 1 M, pH 9,5.

La Figura 5 muestra un resultado representativo del ensayo de escisión de C3b. El carril 1 muestra C3b incubado con CFH únicamente. El carril 2 muestra C3b incubado con CFH y CFIpl. C3b es degradado por CFIpl a iC3b y C3dg. El carril 3 muestra C3b incubado con CFH y sobrenadante de HEK-293 transducido con AAV.CFI. El carril 4-5 muestra C3b incubado con CFH y CFI inmunoprecipitado (denominado como ("CFI IP") de células ARPE-19 transducidas con AAV.CFI (carril 4) o AAV.CFIco (carril 5). El carril 6-7 muestra C3b incubado con CFH y CFI inmunoprecipitado de HEK-293 transducido con AAV.CFI (carril 6) o AAV.CFIco (carril 7). CFI secretado a partir de líneas celulares transducidas es funcionalmente activo y escinde la cadena α de C3b en iC3b. La inmunoprecipitación de CFI conduce a un aumento en la cantidad total de CFI que se refleja en la aparición de la banda C3dg además de la banda del fragmento α' 1 de iC3b. Esta segunda escisión solo ocurre a baja fuerza iónica y a baja velocidad, lo que requiere la presencia de más CFI.

Análisis *in vitro* de la expresión de CFI en ARPE-19 transducido cultivado en un filtro Transwell permeable.

Las células RPE son células pigmentadas que no se dividen y que exhiben polarización morfológica cuando se colocan en placas sobre filtros Transwell-COL recubiertos con laminina en un medio con una concentración sérica baja. El filtro Transwell (insertos de membrana de poliéster, diámetro de poro de 0,4 μ m, diámetro de membrana de 12 mm) funciona para separar los pozos de cultivo en dos compartimentos, el dominio apical (superior) corresponde al lado que mira hacia la retina de la monocapa de RPE y el dominio basolateral (inferior) correspondiente al lado coroideo de la monocapa de RPE. Cuando se dejan en condiciones de medio de suero bajo, las células ARPE-19 se diferenciarán y se convertirán en células hexagonales ligeramente pigmentadas. El modelo Transwell puede usarse para evaluar la expresión en células inactivas, para reflejar la situación *in vivo*.

Se recubrieron placas Transwell con 8 μ g/mL de laminina (Sigma) y se sembraron células ARPE-19 en medio FBS al 10% como monocapas en placas Transwell. Después de 48 horas, el medio se cambió a medio FBS al 1% y las células se transdujeron con un MOI de 10⁵/célula (AAV.CFI, AAV.CFIco y AAV.GFP). Después de 7 días, se recogió el sobrenadante de ambos compartimentos y se aclaró mediante centrifugación. Debido al volumen diferente en el compartimento superior e inferior, es decir, 500 μ L de medio en el compartimento superior y 1500 μ L en el inferior, el sobrenadante se analizó normalizado al volumen total: 30 μ L de sobrenadante del compartimento inferior se mezclaron con tampón Laemmli 4x y 10 μ L de sobrenadante del compartimento superior se mezclaron con Tampón Laemmli 4x. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida prefabricado al 10%. Se detectó CFI con OX21 (Tabla 1) y anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Tabla 1) diluido en tampón de bloqueo. Para la tinción de núcleos, las células se lavaron 2 veces con PBS (Gibco) y se fijaron durante 15 minutos con paraformaldehído (Sigma) al 4% en PBS y se permeabilizaron durante 45 minutos con BSA al 1% (Thermo Fisher Scientific) - Triton X-100 al 0,1% (Sigma) en PBS. Se incubó Hoechst (Thermo Fisher Scientific) a razón de 1:5000 en tampón de permeabilización durante 15 minutos y se evaluó la tinción de los núcleos.

La Figura 6 muestra la inmunotransferencia de CFI secretada a partir de células ARPE-19 cultivadas en placas Transwell. Las células no se diferenciaron en células hexagonales, sin embargo, se cultivaron como una monocapa confluyente de células y la división celular se redujo al mínimo mediante la adición de medio de suero al 1%. 6A: Se cargó el sobrenadante de ambos compartimentos en condiciones no reductoras y se realizó un análisis de transferencia Western usando un anticuerpo monoclonal de ratón para CFI (Ap = compartimento apical y BI = compartimento basolateral). Se muestra que CFI se expresa a partir de una monocapa confluyente de células y que la proteína secretada se detecta en ambos compartimentos. 6B: Se realizó la tinción con Hoechst de los núcleos para confirmar la presencia de una monocapa de células (la tinción se realizó después de recolectar el sobrenadante).

Análisis de expresión *in vivo* de AAV.CFI y AAV.CFIco, inyección subretiniana de ratones C57/Black 6, análisis de la expresión de CFI por inmunotransferencia, qPCR e inmunohistoquímica

5 Inyecciones subretinianas

Se utilizaron ratones C57BL/6J hembra de 8-10 semanas de edad (Charles River Laboratories) para todos los experimentos. Todos los animales utilizados en este estudio fueron tratados con humanidad de acuerdo con las Regulaciones del Ministerio del Interior del Reino Unido bajo la licencia de proyecto 30/3363. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas.

Los ratones se anestesiaron con una mezcla de xilacina (10 mg/kg)/ketamina (80 mg/kg) en solución salina estéril; las pupilas se dilataron con clorhidrato de fenilefrina (2,5%) y tropicamida (1%). Se utilizaron gotas oftálmicas de clorhidrato de proximetacaína (0,5%) para anestesia local adicional. Se realizó una punción en la cámara anterior antes de la inyección subretiniana utilizando agujas estériles de 33G (TSK Laboratory) y gel de carbómero (Viscotears, Novartis Pharmaceuticals Ltd) y se utilizó un cubreobjetos de vidrio circular pequeño para lograr una buena visualización del fondo de ojo. La inyección se realizó a través de la retina posterior usando una jeringa NanoFil de 10 μ L y una aguja NanoFil biselada de 35G (World Precision Instruments Ltd). La anestesia se revirtió con atipamezol (2 mg/kg) en solución salina estéril.

Se inyectaron ratones con dos dosis diferentes (10^7 copias del genoma [gc]/ojo y 10^8 gc/ojo) y dos construcciones de AAV (AAV.CFI y AAV.CFIco). Se inyectó a tres ratones una tercera dosis, 10^9 gc/ojo de AAV.CFIco; estos ratones se utilizaron para la calibración de inmunotransferencias. El virus se diluyó en PF68 al 0,001% (Gibco) en PBS (Gibco) y se realizaron inyecciones simuladas usando el mismo diluyente. Se inyectaron subretinalmente 12 ojos por condición.

25 Preparación de muestras de tejido para inmunotransferencia de CFI

Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical 4 semanas después de la inyección. Se quitaron los ojos y se prepararon como sigue. Usando un microscopio de disección se hizo una incisión en la córnea. El ojo se divide en córnea/iris (segmento anterior), cristalino y ocular posterior. Para una muestra de ocular completo, el ocular posterior se coloca en un tubo estéril. Para algunos ojos, la retina y el RPE/coroides/esclerótica se separaron despegando suavemente la retina del complejo RPE/coroides/esclerótica. Se reunieron muestras de tres ratones por condición (Figura 7A), excepto en ojos inyectados con 10^9 gc/ojo de AAV.CFIco (Figura 7B) en las que se reunieron muestras de dos ratones y se compararon con el ojo contralateral no inyectado. Todas las muestras se colocaron inmediatamente en hielo seco para evitar la degradación de las proteínas y se mantuvieron a -80 °C. Para la inmunotransferencia, las muestras se homogeneizaron en tampón de lisis RIPA 1x (Merck Millipore) suplementado con el cóctel inhibidor de proteasa sin EDTA completo^{MR} (Roche) y las células se rompieron mecánicamente mediante mortero y pistilo y mediante sonicación. La proteína insoluble se centrifugó y el sobrenadante se dividió en alícuotas y se almacenó a -80 °C. La concentración de proteína se determinó usando el kit de ensayo de proteína BCA de Pierce (Thermo Fisher Scientific) y se cargaron 40 μ g de lisado de proteína en tampón Laemmli 4x (Tris-HCl 250 mM (pH 6,8), SDS al 8%, glicerol al 40% y azul de bromofenol al 0,02%). Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida prefabricado al 10% (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad) mediante transferencia semiseca, después de lo cual la membrana se bloqueó en tampón de bloqueo (1xTBS pH 8 [Sigma], Tween-20 al 0,05% y leche desnatada en polvo seca al 5% [Marvel]). El CFI se detectó con a) reducido: antisuero contra CFI humano (Tabla 1) y anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado con HRP (Tabla 1) ob no reducido: OX21 (Tabla 1) y anticuerpo de burro anti-IgG de ratón conjugado HRP (Abcam) diluido en tampón de bloqueo. Para la detección de actina β , se despojo la membrana usando tampón de restablecimiento de despojamiento de transferencia Western (Thermo Fisher Scientific) y se volvió a analizar usando anti-actina P (Tabla 1) y anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Tabla 1) diluido en tampón de bloqueo. Alternativamente, se usó anticuerpo de ratón anti-actina β en combinación con antisuero de cabra para CFI.

La Figura 7 muestra la expresión de la proteína CFI de muestras combinadas analizadas por inmunotransferencia. El CFI se expresa a niveles detectables en todas las dosis y tanto de AAV.CFI como de AAV.CFIco. Se cargó actina β como control de carga. 7A: Se cargaron 40 μ g de lisado de proteína en condiciones reductoras y se detectó CFI con un anticuerpo policlonal de cabra para CFI humano. El CFI se detecta como 80 kDa (proenzima), 50 kDa (procesado; cadena pesada) y 35 kDa (procesado; cadena ligera). Estas bandas corresponden al tamaño esperado de CFI y confirman el procesamiento, es decir, la presencia de cadena pesada y ligera. 7B: También se cargó la misma cantidad de lisado de proteína para muestras de lisado de ojos inyectados con 10^9 gc/ojo de AAV.CFIco u ojos no inyectados. CFI se detectó con un anticuerpo monoclonal de ratón para CFI (izquierda, gel no reductor) y antisuero de cabra para CFI (derecha, gel reductor). El gel no reductor (izquierda) detecta CFI como una banda a 75 kDa en animales inyectados y no se detecta ninguna banda en el ojo no inyectado. En el gel reductor (derecha) el CFI aparece como 80 kDa (proenzima), 50 kDa (procesado; cadena pesada) y 35 kDa (procesado; cadena ligera).

65 Preparación de muestras de tejido para análisis de expresión génica

Los ratones se sacrificaron como se describió anteriormente y los oculares posteriores se dejaron intactos o la retina y el RPE se separaron como se describió anteriormente. Las muestras de tejido se colocaron inmediatamente en tubos estériles que contenían RNALater (Thermo Fisher Scientific). Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su posterior procesamiento. El ARN se aisló utilizando el Mini kit RNeasy (Qiagen) y el tejido se homogeneizó utilizando un mortero y un pistilo en tampón RLT (proporcionado con el kit). Se añadió un tratamiento complementario con DNasa libre de RNasa (Qiagen) para asegurar la ausencia de ADN genómico. Se sometieron a transcripción inversa 100 ng de ARN a ADNc usando el kit de síntesis de la primera cadena Superscript III (Thermo Fisher Scientific). Después de la transcripción inversa, la reacción se limpió con el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen). La qPCR se realizó en el ADNc de un ojo por condición (simulado, CFI 10⁷ gc/ojo, CFI 10⁸ gc/ojo, CFico 10⁷ gc/ojo y CFico 10⁸ gc/ojo) usando un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX Connect^{MR} (Bio-Rad). Se usaron 1,25 ng de ADNc por pozo como plantilla para las reacciones de qPCR con una mezcla maestra SYBR Green (iQaq Universal SYBR Green Supermix, Bio Rad). Cada condición se realizó por triplicado; los valores de Ct se obtuvieron utilizando el software proporcionado. Se utilizó un análisis comparativo de $\Delta\Delta Ct$ con actina beta de ratón como gen de mantenimiento para determinar la expresión relativa de CFI para los controles simulados.

La Figura 8 muestra el análisis de expresión génica mediante qPCR. Como era de esperar, no hubo expresión de CFI o CFico humano en ratones inyectados de forma simulada. Dado que solo se analizó un ojo por condición, no se pudieron realizar análisis estadísticos. El CFI se expresa a partir de ambas construcciones de AAV y la expresión aparentemente se produce predominantemente en el RPE, sin embargo, la inyección de 10⁸ gc/ojo conduce a un aumento de la expresión del ARNm de CFI en el tejido retiniano. En la muestra ocular, se espera que la cantidad de ARNm de CFI con respecto al ARNm ocular total sea menor que en RPE solamente, ya que muchas áreas del ojo no tendrán expresión de CFI; esto se refleja en los resultados.

Preparación de secciones retinianas para inmunohistoquímica.

Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical (4 semanas después de la inyección). Se removieron los ojos y se prepararon como sigue. Se hizo un orificio justo detrás de la ora serrata y se colocó el globo ocular en paraformaldehído al 4% (p/v) en tampón de fosfato 0,12 M, pH 7,2 durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se retiró el segmento anterior y la lente y se prepararon los ojos para secciones o montaje completo. Los oculares utilizados para las secciones se criopreservaron con concentraciones crecientes de sacarosa en tampón de fosfato 0,12 M, pH 7,2 (10%, durante 1 hora a temperatura ambiente y 30% durante la noche a + 4 °C), embebidos en OCT (Tissue-tek, Sakura Finetek USA Inc., Ca, EE. UU.) y congelados en un molde a -80 °C. Las secciones se cortaron con un espesor de 10 μ m en un criostato y se montaron en portaobjetos de vidrio (Super-Frost, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). Los portaobjetos se secaron al aire durante 2 horas a temperatura ambiente y se almacenaron a -80 °C. Para los oculares utilizados para preparaciones completas, la retina y el RPE/coroides se separaron despegando suavemente la retina del RPE y se almacenaron por separado en PBS a + 4 °C.

Inmunotinción

Las secciones se bloquearon y se permeabilizaron mediante incubación a temperatura ambiente durante 60 min en solución de PBSGT (gelatina al 0,2% (p/v), Triton X-100 al 0,25% (v/v) en PBS). Los montajes completos se bloquearon y se permeabilizaron mediante incubación a temperatura ambiente durante 2 horas en gelatina al 0,2% (p/v), Triton X-100 al 1,5% (v/v) en PBS. Posteriormente, las secciones y los montajes completos se incubaron con anticuerpos primarios (véase la Tabla 1) diluidos en solución de PBSGT durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavar en solución de PBST (Triton X-100 al 0,1% (v/v) en PBS), las secciones y los montajes completos se incubaron con anticuerpos secundarios acoplados a Alexa Fluor594 (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE. UU.) a una dilución de 1: 5000 y se tiñeron con DAPI en solución de PBSGT durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron con solución de PBST y posteriormente se cubrieron con medio de montaje (Mowiol, Merck Millipore).

Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica en este estudio.

Anticuerpo	Número de parte	Compañía	Dilución
anti-hCFI de conejo	HPA024061	Sigma Aldrich	1/250
Faloidina Alexa Fluor 488	A12379	Life Technologies	1/5000

La Figura 9 muestra la localización de fibronectina y hCFI en secciones retinianas de ojos inyectados en forma simulada y con AAV.CFI y AAV.CFico. La fibronectina se utiliza como comarcador para distinguir las diferentes capas retinianas. Tanto para los ojos inyectados con AAV.CFI como con AAV.CFico, hCFI se localiza en varios compartimentos: ligeramente en la esclerótica (Scl), fuertemente en el RPE, el segmento externo (OS) y el interno (IS) de los fotorreceptores, la capa plexiforme externa (OPL) y presumiblemente en la capa de células ganglionares (GCL) y la capa de fibras nerviosas (NFL). Una leve señal en GCL + NFL es visible para ojos inyectados en forma simulada, lo que muestra que el anticuerpo no es completamente específico en estas capas.

Las Figuras 10 a 13 muestran un aumento mayor de las diferentes regiones en las que se localiza hCFI para secciones retinianas de ojos inyectados en forma simulada y con AAV.CFI. Se observa la misma señal para las secciones de retina del ojo inyectado con AAV.CFico y no se muestran.

La Figura 10 muestra una mayor ampliación de la región de RPE para secciones retinianas de ojos inyectados en forma simulada y con AAV.CFI. hCFI se localiza en toda la capa del RPE y en las microvellosidades del RPE. La tinción es vesicular, lo que sugiere una localización de la vía secretora de hCFI.

La Figura 11 muestra una mayor ampliación de la región del fotorreceptor para secciones retinianas de ojos inyectados en forma simulada y con AAV.CFI. hCFI se localiza en los segmentos internos y externos de los fotorreceptores, pero no estaba presente en la región del retículo nuclear/endoplásmico de los fotorreceptores.

La Figura 12 muestra una mayor ampliación de la capa plexiforme externa para secciones retinianas de ojos inyectados en forma simulada y con AAV.CFI. hCFI se localiza en cuerpos celulares, lo que sugiere tinción celular horizontal. En ausencia de un marcador celular horizontal, las siguientes referencias son indicativas de cómo aparece la expresión en células horizontales en inmunohistoquímica: Poche et al., (2009), *Development*, 136: 2141-51; Cuenca et al., (2010), *Exp Eye Res.*, 91: 273-85; Ho et al., (2012), *PLoS One*, 7: e29892.

La Figura 13 muestra una mayor ampliación de la región de la capa de células ganglionares para secciones retinianas de ojos inyectados en forma simulada y con AAV.CFI. Aunque la intensidad en la capa de fibras nerviosas para el etiquetado de hCFI en secciones de retina de ojos inyectados con AAV.CFI parece ser mayor que la intensidad de secciones de retina de ojos inyectados en forma simulada, es difícil determinar si hCFI se localiza en la capa de fibras nerviosas.

La Figura 14 muestra la localización de fibronectina y hCFI en ojos inyectados en forma simulada y con AAV.CFI y AAV.CFIco con RPE de montaje completo en ojos. Para los ojos inyectados con AAV.CFI y AAV.CFIco, hCFI se localiza en las células del RPE. La tinción está puntuada y parece localizarse en vesículas de la vía secretora en la que se procesa hCFI.

Ejemplo 2

Ensayo funcional *in vivo* de la capacidad de AAV.CFI o AAV.CFIco para mitigar el daño retiniano inducido por la luz

Se alojan ratones Albinos BALB/c en las instalaciones de cuidado animal en un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad con acceso a comida y agua a voluntad. La intensidad de la luz ambiental al nivel de los ojos de los animales es de 85 ± 18 lux. Todos los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo con la Declaración de ARVO para el uso de animales en la investigación oftálmica y de la visión y están aprobados por la oficina central.

Para el modelo de atrofia geográfica (Bärbel Rohrer; Yao Guo; Kannan Kunchithapautham; Gary S. Gilkeson, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, noviembre de 2007, Vol.48, 5282-5289) se movieron ratones adultos (aproximadamente de 1 año de edad) a una sala de tratamiento con luz y se adaptó a la oscuridad durante la noche. Los animales se alojan de a dos por jaula en jaulas de vidrio acrílico transparente (Plexiglas; Rohm and Haas, Filadelfia, PA) con acceso libre a alimentos y agua. El daño por luz se induce exponiendo a los animales a 1000 lux de luz blanca proporcionada por dos bombillas fluorescentes de 30 W (T30T12-CW-RS; General Electric, Piscataway, NJ) suspendidas aproximadamente a 40 cm por encima de las jaulas. La intensidad de la luz se mide usando un medidor de luz (Extech Instruments, Waltham, MA) para asegurar que se proporcione la misma luminancia a todos los animales. Esta cantidad de luz reduce el número de bastones a una fila en 2 a 3 semanas en ratones albinos.

Para probar el papel del factor I del complemento (CFI) en la pérdida inducida por la luz de las neuronas retinianas externas, los ratones se exponen a CFI-AAV.CFI (o AAV.CFIco), GFP-AAV.GFP de control o inyección simulada a través de la ruta subretiniana. Normalmente se utilizan cohortes de 6-8 ratones. Después de 3-4 semanas de exposición a AAV, se inicia el daño inducido por la luz como se detalló anteriormente. Después de 2-3 semanas, se realiza una electroretinografía (ERG). Los animales se anestesian con xilacina y ketamina (20 y 80 mg/kg, respectivamente) y se dilatan las pupilas con 1 gota de fenilefrina HCl (2,5%) y sulfato de atropina (1%) y se colocan en un bloque calentado mantenido a 37 °C dentro de una jaula de Faraday hermética a la luz. La estimulación de luz se proporciona mediante la configuración ERG proporcionada por Micron IV (Phoenix Labs). La señal óptica se controla con obturadores mecánicos, densidad neutra operada manualmente y un filtro de paso de banda de 500 nm. La intensidad de la luz por flash de 10 ms proporcionado en la trayectoria del estímulo se puede variar en etapas de 0,3 unidades logarítmicas desde $3,0 \times 10^5$ hasta $3,0 \times 10^{11}$ fotones/mm². Los electroretinogramas escotópicos se registran en respuesta a la estimulación de un solo destello de intensidades de luz crecientes, con un promedio de tres a cinco respuestas. La amplitud máxima de la onda A se mide desde la línea base hasta el voltaje inicial negativo, mientras que la amplitud máxima de la onda B se mide desde el valle de la onda A hasta el pico de la onda B positivo. Después de ERG, se obtienen los ojos del ratón y se procesan para histología usando tinción con hematoxilina y eosina y se cuantifica el grosor de las capas nucleares externas de la retina.

La expectativa es que la reducción de la actividad de la vía alternativa del complemento usando exposición a CFI-AAV.CFI/AAV.CFIco preservará la función ERG y reducirá la pérdida de neuronas retinianas externas.

5 En resumen, el virus adenoasociado es un vehículo eficaz para permitir la expresión sostenida del factor I del
complemento, un regulador de la ruta alternativa del complemento. Se ha demostrado sorprendentemente que el CFI
administrado a través de AAV se expresa, se procesa correctamente y se secreta en una forma funcionalmente activa
en células RPE humanas tanto activas como confluentes. Estos datos muestran que el RPE humano contiene las
10 convertasas de proproteína necesarias para secretar CFI en una forma funcional. En experimentos de traslación con
animales, la administración subretiniana de CFI.AAV condujo a una expresión fácilmente detectable de una forma
procesada funcionalmente de hCFI producida por células RPE de ratón. La inmunotinción también sugiere que a pesar
de la falta de expresión intracelular de hCFI en los fotorreceptores de ratón, la proteína estaba presente en la región
del segmento interno y externo de los fotorreceptores, lo que sugiere que hCFI secretada por el RPE se difunde y
15 podría potencialmente desempeñar su papel regulador crítico de la vía del complemento en una amplia región de la
corioretina. Dados los datos que relacionan la desregulación del complemento con la degeneración macular
relacionada con la edad, este nuevo enfoque terapéutico podría desempeñar un papel fundamental en el tratamiento
sostenido de esta condición de ceguera.

15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un vector viral adenoasociado (AAV) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o un fragmento del mismo capaz de escindir C3b en iC3b, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo está operativamente unido a un elemento regulador transcripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE).
- 10 2. El vector AAV de la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo es de codón optimizado.
- 15 3. El vector AAV de la reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
 - (a) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 1 o 9;
 - (b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70% de identidad con la SEQ ID NO: 2 u 8; y
 - (c) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 u 8.
- 20 4. El vector AAV de cualquier reivindicación anterior, en el que el vector viral está en forma de partícula viral.
- 25 5. El vector AAV de la reivindicación 4, en el que la partícula viral AAV comprende un genoma de AAV2 y proteínas de la cápside de AAV2, o un genoma de AAV2 y proteínas de la cápside de AAV5, o un genoma de AAV2 y proteínas de la cápside de AAV8.
- 30 6. El vector AAV de cualquier reivindicación anterior, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo está operativamente enlazada a un promotor específico de células retinianas; preferiblemente en el que el promotor específico de células retinianas se selecciona de un promotor de rodopsina quinasa, un promotor PR2.1, un promotor RPE65 y un promotor VMD2.
- 35 7. El vector AAV de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo está operativamente enlazada a un promotor de actina beta de pollo (CBA).
8. El vector AAV de cualquier reivindicación anterior, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo está operativamente enlazada a un promotor CAG, preferiblemente un promotor con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.
- 40 9. El vector AAV de cualquier reivindicación anterior, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo está operativamente enlazada a un elemento potenciador de citomegalovirus (CMV).
- 45 10. El vector AAV de cualquier reivindicación anterior, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo está operativamente enlazada a una señal poli-A de la hormona de crecimiento bovino, preferiblemente una señal poli-A de la hormona de crecimiento bovino que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID. NO: 6.
- 50 11. El vector AAV de cualquier reivindicación anterior, en el que el WPRE tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.
- 55 12. Una célula aislada transfectada con y que comprende el vector AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11.
- 60 13. Una composición farmacéutica que comprende el vector AAV de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la célula aislada de la reivindicación 12 en combinación con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 65 14. El vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad ocular.
15. El vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno del ojo mediado por el complemento; preferiblemente en el que el trastorno es degeneración macular relacionada con la edad (AMD) o retinopatía diabética, preferiblemente AMD; preferiblemente en la que AMD es AMD seca.
16. El vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que se previene o reduce la formación de atrofia geográfica y/o se reduce la cantidad de atrofia geográfica.

- 5 17. El vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la progresión de la atrofia geográfica se ralentiza; preferiblemente en el que hay al menos una reducción del 10% en el aumento del área de atrofia geográfica durante los 12 meses siguientes a la administración a un ojo tratado de un sujeto, en relación con un ojo no tratado durante el mismo período.
- 10 18. El vector de AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-17, en el que la administración del vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica aumenta el nivel de actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b en un sujeto, o en un ojo, tal como en el epitelio pigmentario de la retina (RPE), de un sujeto, opcionalmente hasta un nivel que excede un nivel normal en un sujeto, o en el ojo o RPE del mismo.
- 15 19. El vector de AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-18, en el que el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica se administra por vía intraocular.
- 20 20. El vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-19, en el que el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica se administra al ojo de un sujeto por inyección subretiniana, retiniana directa, supracoroidea o intravítrea.
- 20 21. El vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15-20, en el que el vector AAV, una célula aislada o la composición farmacéutica se administra al ojo de un sujeto mediante inyección subretiniana.

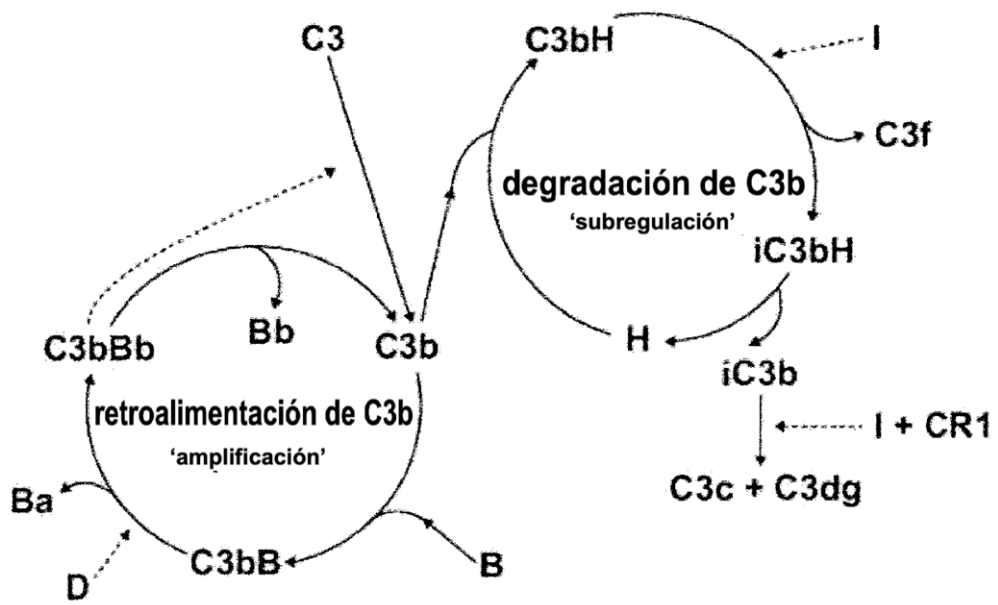


Figura 1

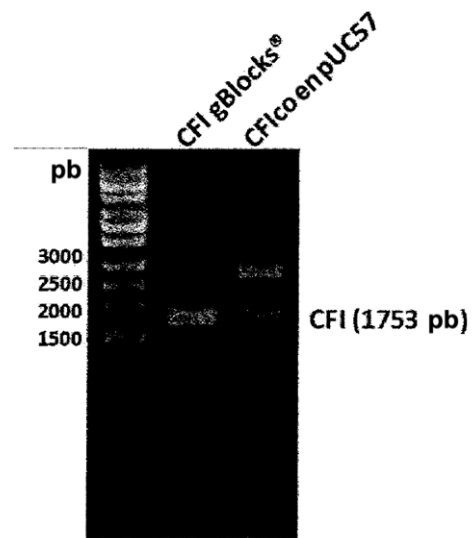


Figura 2

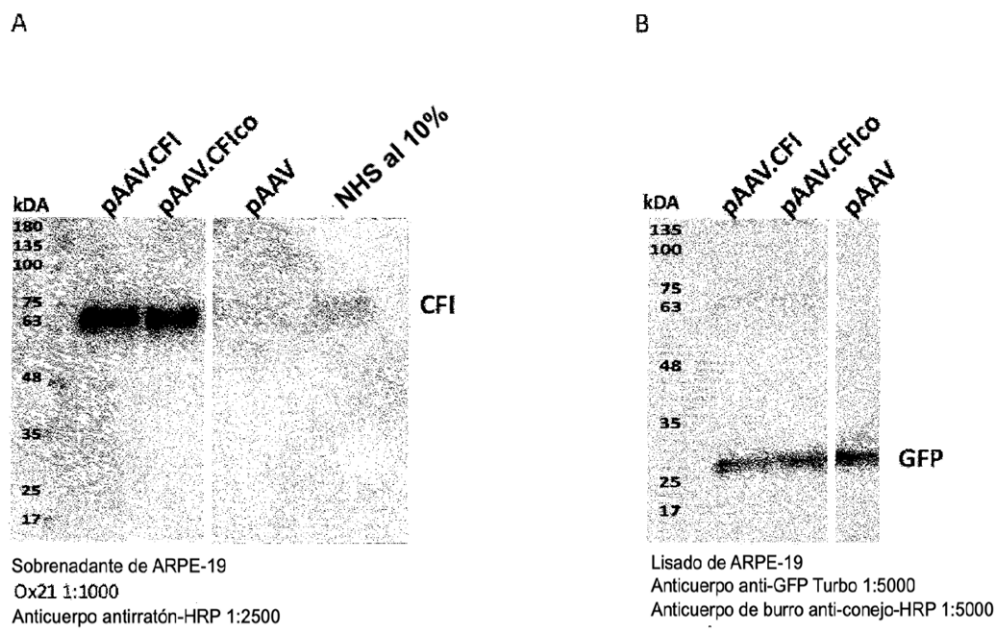
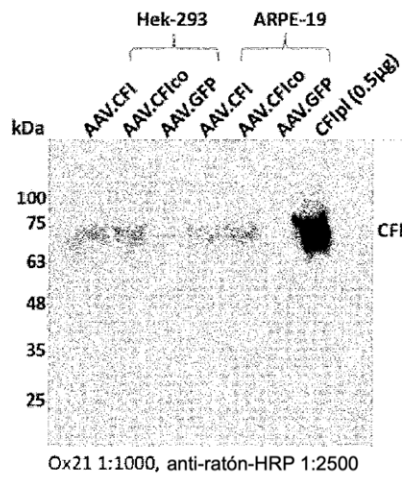


Figura 3

A



B

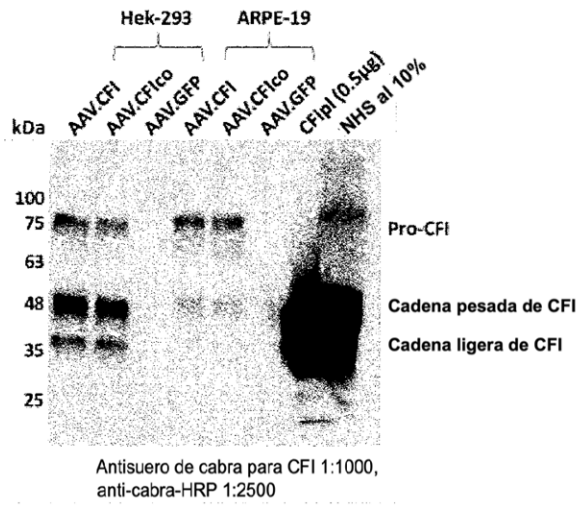


Figura 4

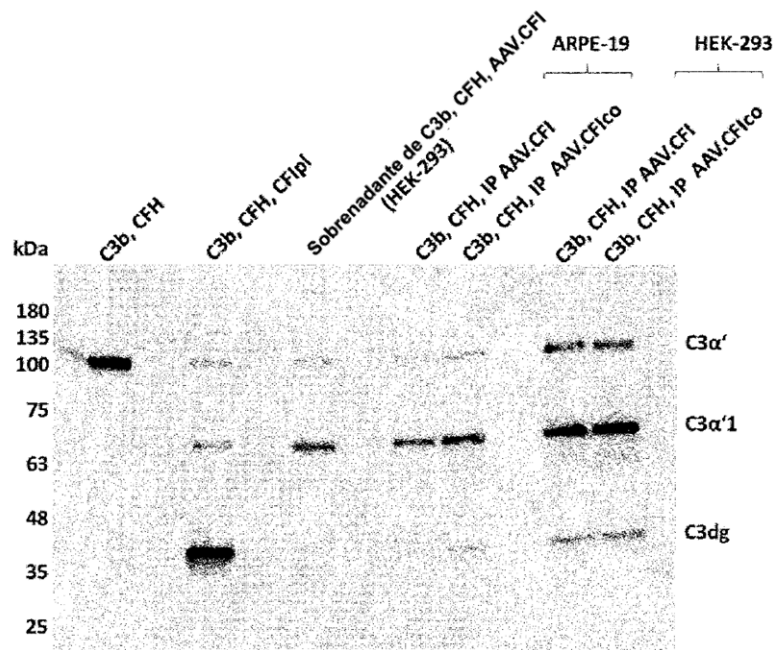


Figura 5

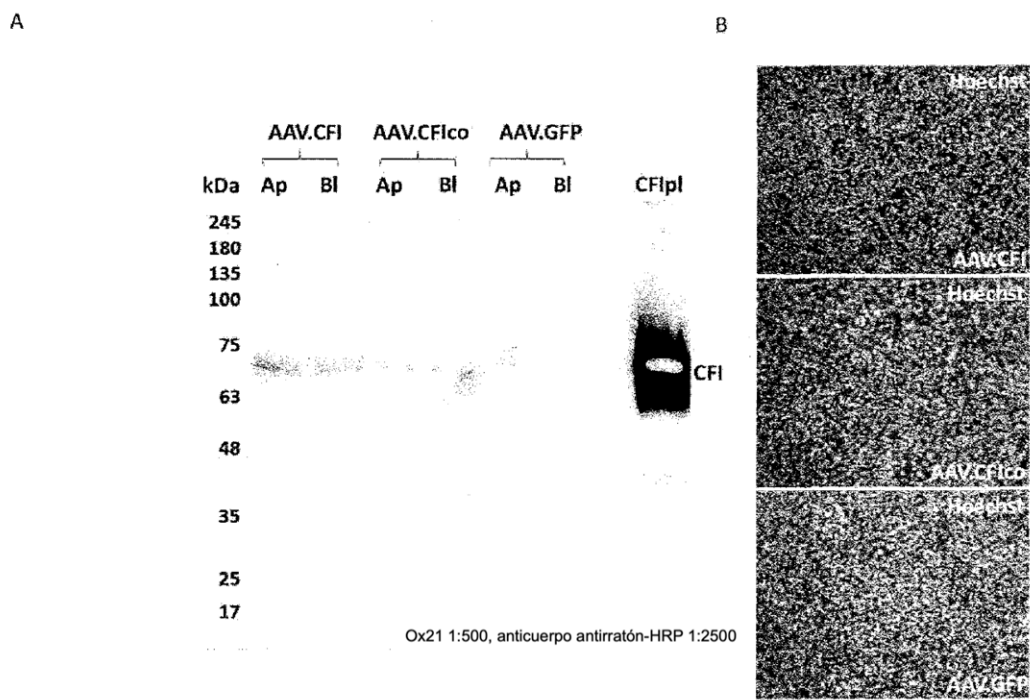
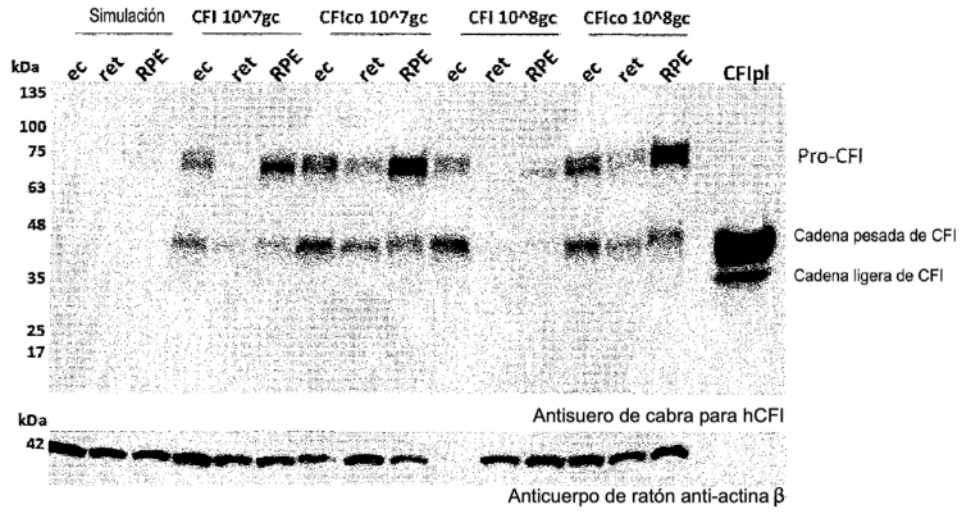


Figura 6

A



B

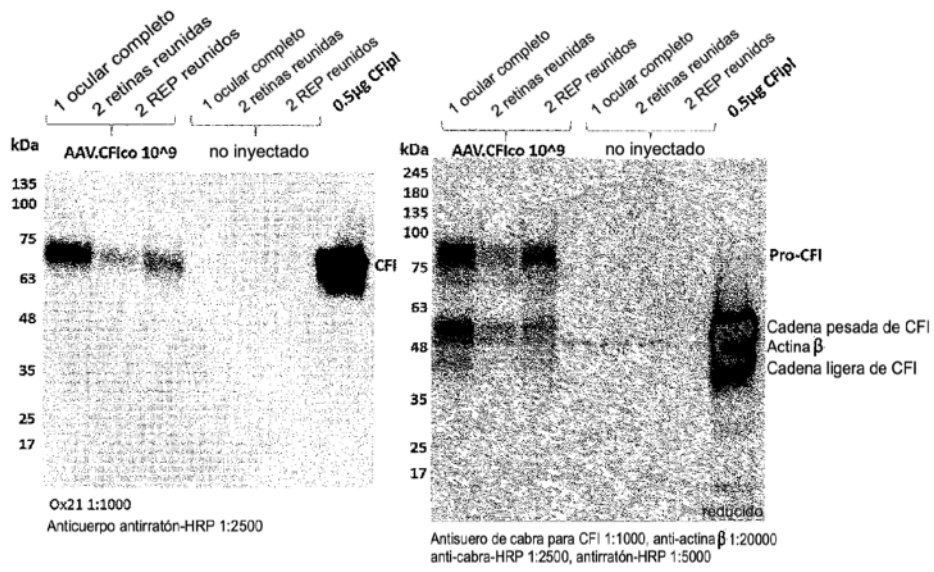


Figura 7

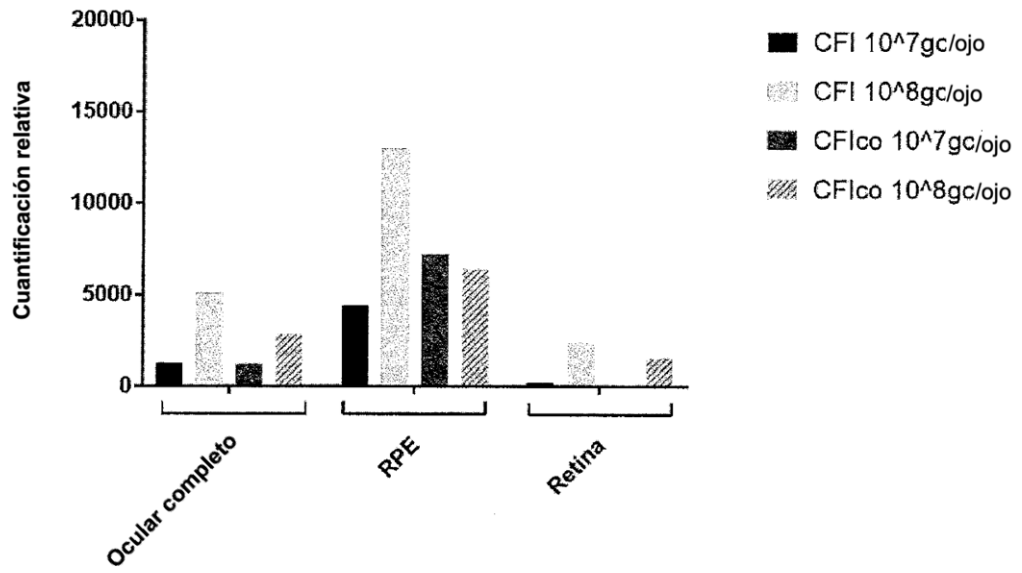


Figura 8

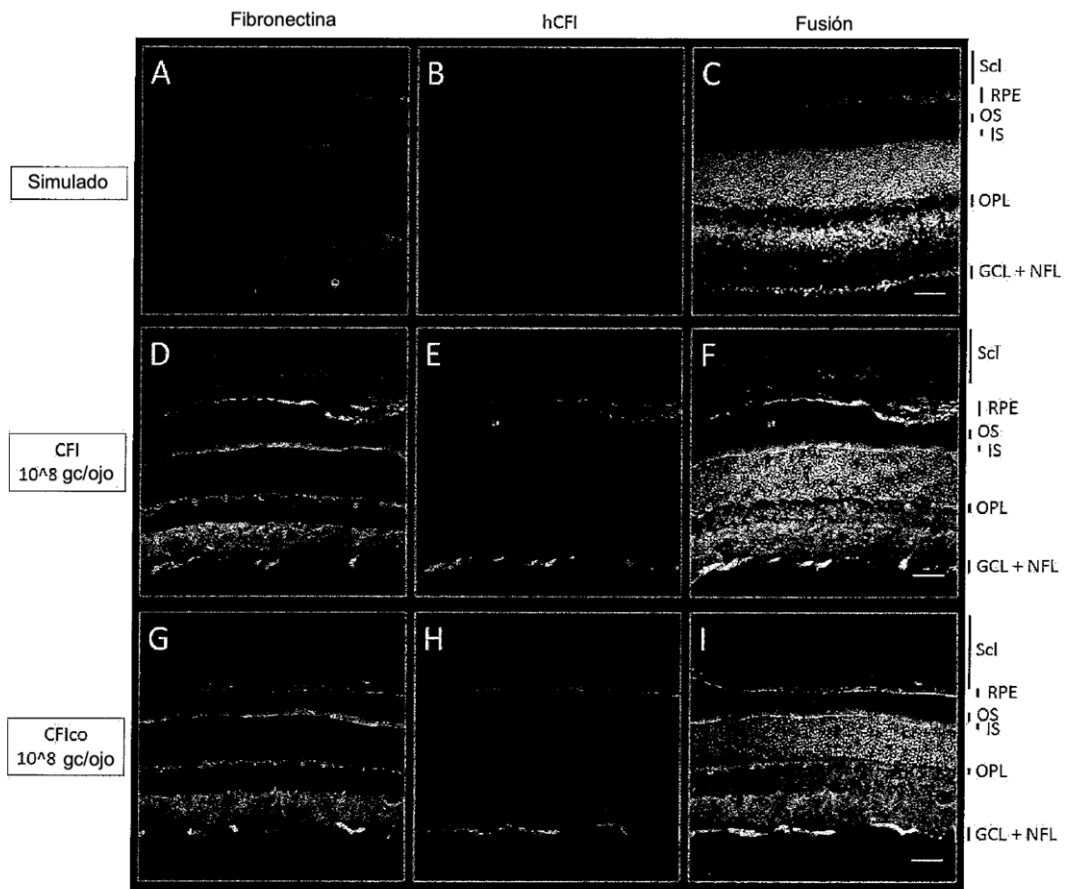


Figura 9

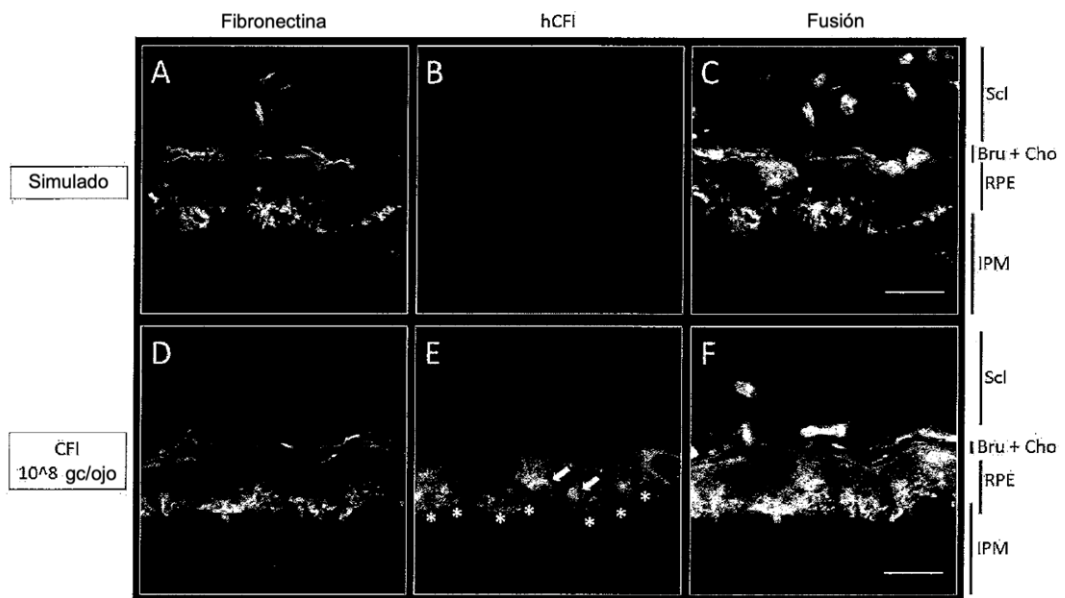


Figura 10

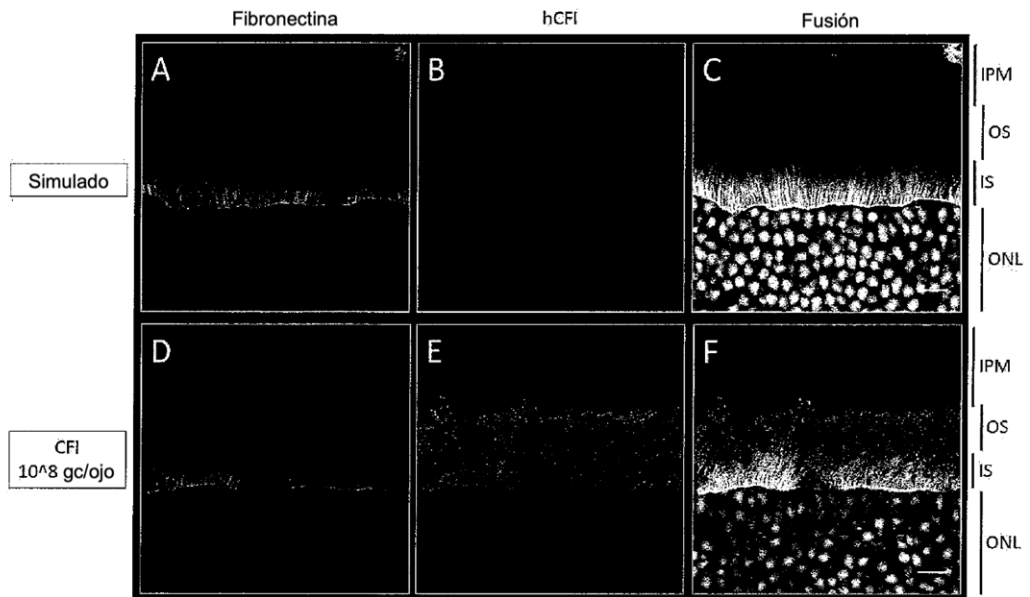


Figura 11

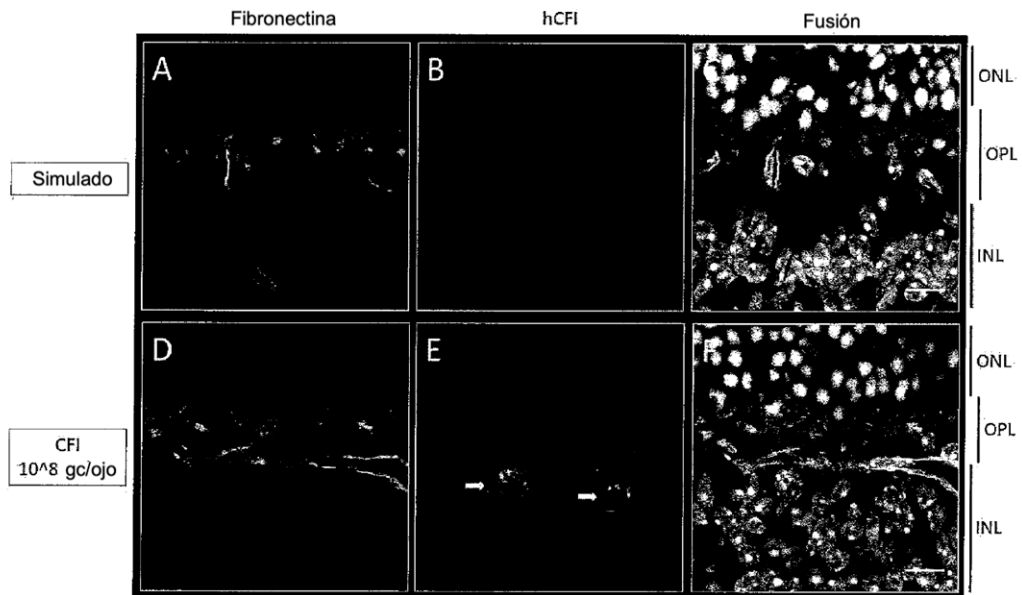


Figura 12

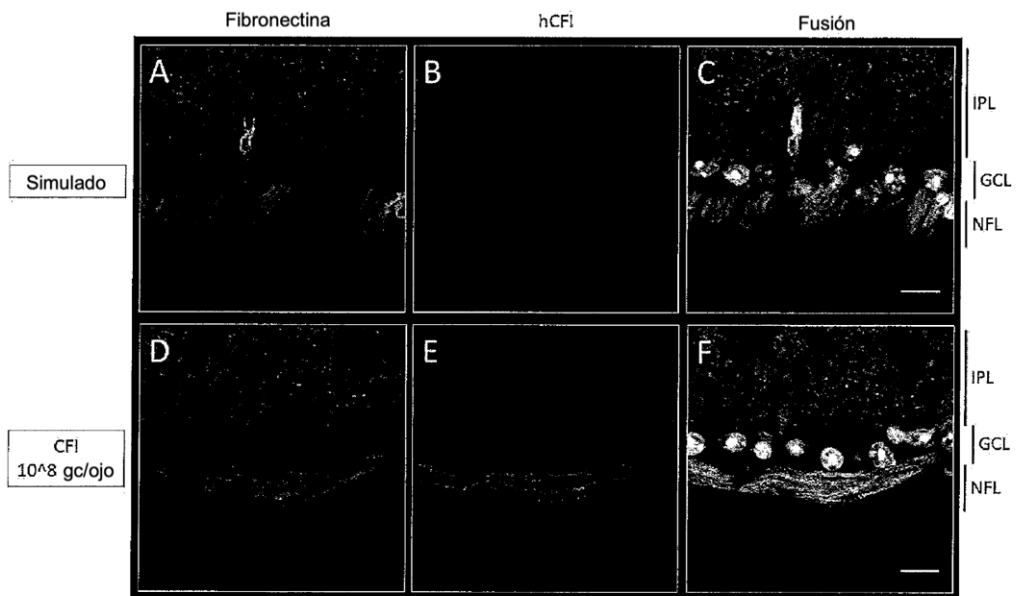


Figura 13

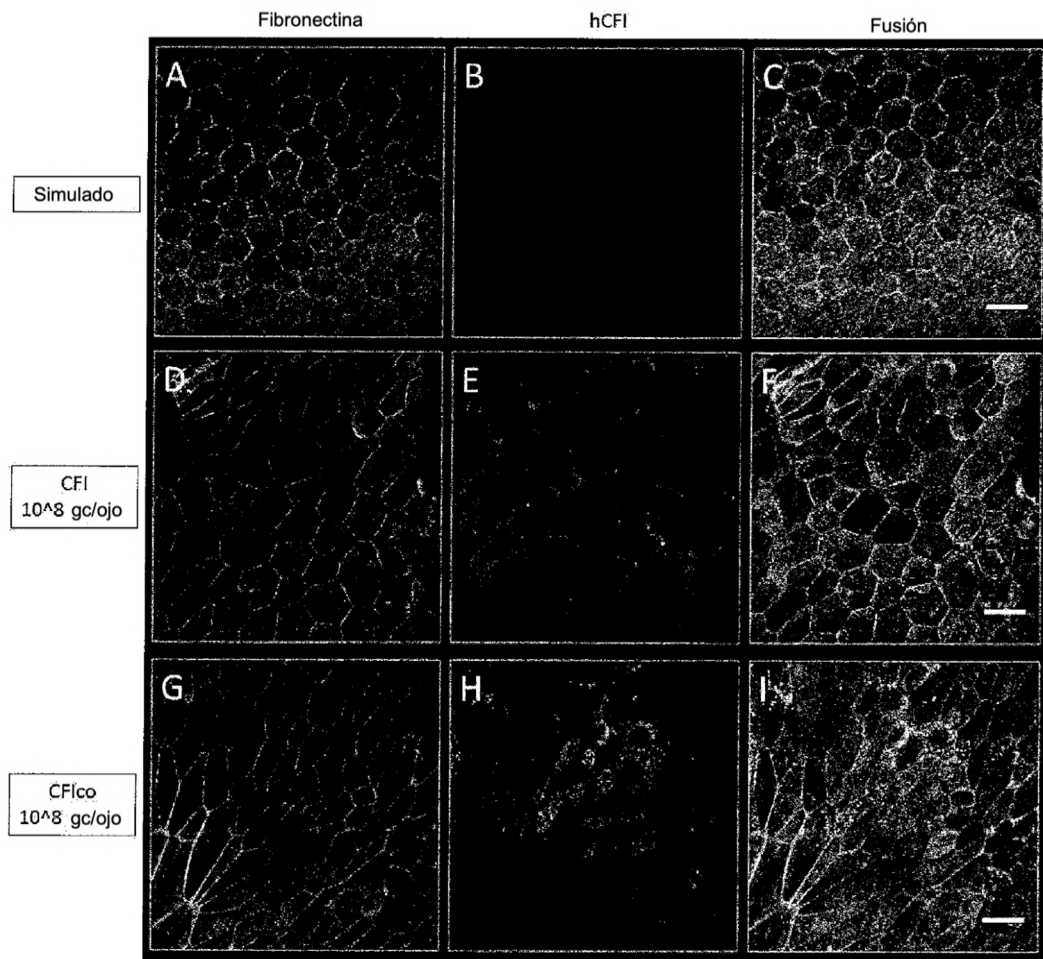


Figura 14