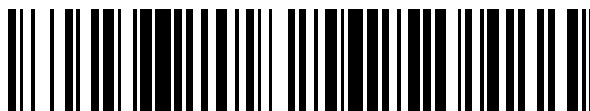


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 666 204**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2016** **PCT/GB2016/053343**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017** **WO17072515**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2016** **E 16788764 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2018** **EP 3262066**

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:

03.05.2018

73 Titular/es:

**SYNCONA INVESTMENT MANAGEMENT LIMITED
(100.0%)
215 Euston Road
London NW1 2BE, GB**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 666 204 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 oftalmopatías. Más específicamente, la invención se refiere a vectores de virus adenoasociados (VAA), para su uso en el tratamiento o la prevención de degeneración macular asociada a la edad (DMAE), en donde los vectores posibilitan la administración de Factor I o fragmentos del mismo al ojo.

Antecedentes de la invención

La mácula es una pequeña área 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 mayor agudeza visual y contiene una densa concentración de conos, los fotorreceptores que son responsables de la visión en color.

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es la causa más común de ceguera funcional en países desarrollados para aquellos de más de 50 años de edad (Seddon, J M. Epidemiology of age-related macular degeneration. En: Ogden, T E, et al., eds. Ryan S J, ed-in-chief. Retina Vol II. 3ª ed. St. Louis, Mo.: Mosby; 2001:1039-50). La DMAE se asocia con la neovascularización que se origina a partir de la vasculatura coroidea y que se extiende hacia el espacio subretiniano. Además, la DMAE se caracteriza por una degeneración progresiva de la retina, el epitelio del pigmento retinal (EPR), y la coroides subyacente (el tejido altamente vascularizado que subyace por debajo del EPR, entre la retina y la esclerótica).

Una variedad de factores que incluyen estrés, inflamación con un posible componente autoinmunológico, el trasfondo genético (por ejemplo, mutaciones) y factores ambientales o comportamentales tales como el hábito fumador y la dieta pueden contribuir a la DMAE.

La progresión clínica de la DMAE se caracteriza en etapas de acuerdo con los cambios en la mácula. El sello distintivo de la DMAE temprana son las drusas, que son acumulaciones de restos extracelulares por debajo de la retina y aparecen como manchas amarillas en la retina en exámenes clínicos y en retinografías. Las drusas se clasifican por tamaño como pequeñas (<63 µm), medias (63-124 µm) y grandes (>124 µm). También se consideran como duras o blandas dependiendo de la apariencia de sus márgenes en el examen oftalmológico. Mientras que las drusas duras tienen márgenes claramente definidos, las blandas tienen márgenes menos definidos y fluidos. La escala de gravedad de las retinografías de estudios de oftalmopatías asociadas a la edad (AREDS, del inglés *Age-related Eye Disease Study*) es uno de los principales sistemas de clasificación usados para esta afección.

La DMAE se ha clasificado como formas "secas" y "húmedas" (exudativa o neovascular). La DMAE seca es más común que la DMAE húmeda, pero la forma seca puede progresar a la forma húmeda, y las dos tienen lugar de manera simultánea en un número significativo de casos. La DMAE seca se caracteriza típicamente mediante la apoptosis progresiva de las células en la capa del EPR, que se superpone a las células fotorreceptoras y, con frecuencia, también a las células subyacentes en la capa capilar coroidea. Las áreas confluentes de la muerte celular del EPR acompañada por la atrofia de fotorreceptores suprayacentes se denominan atrofia geográfica. Los pacientes con esta forma de DMAE experimentan un deterioro lento y progresivo de la visión central.

La DMAE húmeda se caracteriza por el sangrado y/o la filtración de líquido de vasos anómalos que han crecido desde los vasos coroideos (coriocapilares) por debajo del EPR y la mácula, que puede ser responsable de la pérdida de visión repentina e incapacitante. Se ha estimado que gran parte de la pérdida de visión que experimentan los pacientes se debe a tal neovascularización coroidea (NVC) y a sus complicaciones secundarias. Un subtipo de DMAE neovascular se denomina proliferación angiomasosa retiniana (PAR). En el presente caso, la proliferación angiomasosa se origina a partir de la retina y se extiende posteriormente hacia el espacio subretiniano, que eventualmente se comunica en algunos casos con nuevos vasos coroideos.

El sistema del complemento (SC) ha estado implicado en la patogénesis de DMAE temprana basándose en la identificación de los componentes del SC en drusas de ojos de pacientes de DMAE. En la DMAE, se han identificado al menos 129 tipos de proteínas depositadas en drusas, incluyendo diferentes tipos de apolipoproteínas (E, B, o A-I), varios péptidos amiloides (P, Aβ, o SA-1), TIMP-3, albúmina sérica y determinadas proteínas asociadas con la función celular (por ejemplo, la subunidad β de la ATP sintasa, el receptor del fagocito B2, y la retinol deshidrogenasa). Las drusas que provienen de la DMAE también contienen casi todas las proteínas del complemento, incluyendo las proteínas reguladoras (CFH, receptor del complemento 1 (RC1), vitronectina y clusterina), los productos de activación y degradación del SC (C1q, C3, C3a, C3b y C5a), y los miembros de la ruta terminal del SC que comprenden los componentes de MAC (es decir, 5, 6, 8 (α, β y γ), y 9) en la forma separada y en la forma de complejo. La acumulación de drusas puede activar el SC, desencadenar la producción local de

mediadores inflamatorios y atraer a leucocitos que, a su vez, aumentan el estado inflamatorio local presente en la DMAE.

Las opciones de tratamiento actual para la DMAE incluyen la terapia fotodinámica con benzoporfirina (Arch Ophthalmol. 1999;117:1329-1345) y una serie de terapias dirigidas a la ruta del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*). Los ejemplos de tales terapias dirigidas al 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 anticuerpos anti-VEGF y tampoco recuperan la visión o progresan a la ceguera registrada.

Se ha desarrollado una terapia para el tratamiento de atrofia geográfica y actualmente está en un estudio clínico de fase III (estudio MAHALO por Genentech/Roche). Lampalizumab es un anticuerpo inhibidor monoclonal humanizado para complementar el Factor D, administrado mediante inyección intravítrea para detener la tasa de progresión de la atrofia geográfica. Tal como se muestra en la Figura 1, el Factor D es parte del ciclo de retroalimentación de C3b ('amplificación'). El Factor D está presente en concentraciones séricas muy bajas y es un factor esencial para la ruta alternativa. No obstante, debido a su pequeño tamaño (27 kDa), el Factor D se elimina rápidamente mediante los riñones y se resintetiza rápidamente. La terapia requiere inyecciones intravítreas mensuales.

El documento WO 2014/172560 describe composiciones y métodos para tratar la degeneración macular. Los métodos utilizan inhibidores de IL17, tales como receptores de IL17, así como proteínas de fusión que incluyen un receptor de IL17 fusionado con un dominio de multimerización, y vectores víricos recombinantes que codifican tales fusiones.

M T Birke et al. (Gene Therapy, vol. 21, n.º 5, 27 de marzo de 2014) describe que la expresión de PRELP humano mediada por VAA inhibe la activación del complemento, la neovascularización coroidea y la deposición del complejo de ataque a membrana en ratones.

Existe una necesidad en la técnica de nuevas estrategias para la DMAE.

Sumario de la invención

Los presentes inventores actualmente proporcionan una estrategia para modular el sistema del complemento que es útil, por ejemplo, en el tratamiento de la DMAE. Los inventores proporcionan Factor I administrado mediante terapia génica con el objetivo de regular de manera negativa el ciclo de retroalimentación del complemento C3b a través del direccionamiento del ciclo de degradación (Figura 1). El reequilibrio resultante del bucle de retroalimentación de la ruta alternativa promoverá la degradación de C3b e iC3b y, por lo tanto, eliminará los principales factores de enfermedad en trastornos mediados por el complemento, en particular, trastornos que tienen un defecto subyacente en una regulación de la ruta alternativa.

En un aspecto, la invención proporciona un vector de virus adenoasociado (VAA) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o un fragmento del mismo, en donde el fragmento es capaz de escindir C3b en iC3b. También se describe en el presente documento un vector de virus adenoasociado (VAA) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el Factor H o un fragmento o derivado del mismo, un vector de virus adenoasociado (VAA) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-Factor D y un vector de virus adenoasociado (VAA) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-componente 5 (C5) del complemento.

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 el 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o 9;

(b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 o 8; y

(c) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o 8.

Preferentemente, la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo codifica una proteína con la actividad natural del Factor I (por ejemplo, la proteína representada por la SEQ I 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 transformar C3b e iC3b en productos inactivos de degradación. Dicho de otra forma, el Factor I o el fragmento del mismo conserva preferentemente 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 de inactivación de C3b y de degradación de iC3b.

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

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

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

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

20 En una realización, el vector de VAA comprende una señal poli-A de hormona de crecimiento bovina, por ejemplo, unido de manera operativa a la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo, preferentemente, una señal de poli-A de hormona de crecimiento bovina que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6.

25 En una realización, el vector de VAA comprende un elemento regulador postranscripcional de hepatitis de marmota (WPRE, del inglés *woodchuck hepatitis post-transcriptional regulatory element*), por ejemplo, unido de manera operativa a la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo, preferentemente un WPRE que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7.

En una realización preferida, el vector de VAA de la invención está en la forma de una partícula vírica.

30 En una realización preferida, la partícula vírica de VAA comprende un genoma de VAA2 y proteínas de la cápside de VAA2. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo está unida de manera operativa al promotor de CAG, preferentemente un promotor con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.

35 El vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención se puede usar para tratar o evitar un trastorno ocular.

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

45 En una realización, el trastorno se asocia con la sobreactividad del ciclo de retroalimentación del complemento C3b y/o la baja actividad del ciclo de degradación de C3b (véase la Figura 1). En una realización, el trastorno es la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o la retinopatía diabética. En una realización preferida, el trastorno es DMAE, preferentemente DMAE seca.

En una realización, el uso es para el tratamiento o la prevención de un trastorno en un sujeto:

50 (a) que tiene una actividad o concentración del Factor I menor de lo normal en el ojo y/o en el suero, preferentemente, que tiene una concentración de, o una actividad equivalente a, 0-30 o 0-20 o 0-10 µg/ml en suero; y/o

(b) que es heterocigótico u homocigótico para un SNP asociado a la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), preferentemente, una variante poco común del Factor I.

55 En una realización, el uso es para el tratamiento o la prevención de un trastorno en un sujeto:

(a) que tiene una actividad o concentración del Factor I normal en el ojo y/o en el suero, preferentemente al menos 30 µg/ml, tal como 30-40 µg/ml en el suero; y/o

60 (b) que no lleva un alelo de variante poco común del Factor I.

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

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

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

10 En una realización, se ralentiza la progresión de atrofia geográfica. Preferentemente, hay al menos un 10 %, un 20 %, un 30 %, un 40 %, un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 % o un 90 % de reducción en el aumento en el área de atrofia geográfica durante los 12 meses tras la administración a un ojo tratado de un sujeto, en relación con un ojo sin tratar durante el mismo período.

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

20 En otro aspecto, la invención proporciona el vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para su uso en la mejora o la restauración de la velocidad de lectura en un sujeto, por ejemplo, en un sujeto que padece un trastorno ocular, tal como un trastorno ocular desvelado en el presente documento. En otro aspecto, la invención proporciona el vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para su uso en la atenuación de la reducción en la velocidad de lectura en un sujeto, por ejemplo, una reducción en la velocidad de lectura asociada a un trastorno ocular, tal como un trastorno ocular desvelado en el presente documento.

25 En otro aspecto, la invención proporciona el vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para su uso en la reducción o la prevención de la pérdida de fotorreceptores y/o el epitelio pigmentario retinal (EPR), por ejemplo, una pérdida de fotorreceptores y/o el EPR asociado a un trastorno ocular, tal como un trastorno ocular desvelado en el presente documento.

30 En una realización preferida, el vector de VAA, la 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 lograr los niveles requeridos del factor del complemento para el tratamiento o la prevención del trastorno ocular mediado por el complemento, por ejemplo, DMAE.

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

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

45 En una realización, la administración del vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención aumenta de este modo el nivel de actividad de inactivación de C3b y degradación de iC3b en el sujeto, en particular, en el ojo, tal como en el EPR, del sujeto. En otra realización, la administración del vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención aumenta de este modo el nivel de actividad de inactivación de C3b y degradación de iC3b en el sujeto, en particular, en el ojo, tal como en el EPR, del sujeto hasta un nivel que supera un nivel normal en el ojo.

50 También se describe en el presente documento un método de tratamiento o prevención de un trastorno ocular mediado por el complemento que comprende la administración del vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención a un sujeto que lo necesite.

55 En una realización, el trastorno se asocia con la sobreactividad del ciclo de retroalimentación del complemento C3b y/o la baja actividad del ciclo de degradación de C3b. En una realización, el trastorno es la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o la retinopatía diabética. En una realización preferida, el trastorno es DMAE, preferentemente DMAE seca.

60 También se describe en el presente documento un método de tratamiento o prevención de la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) que comprende la administración del vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención a un sujeto que lo necesite. La DMAE puede, por ejemplo, ser DMAE seca. En una realización preferida, la DMAE es DMAE seca.

65 También se describe en el presente documento un método de tratamiento o prevención de retinopatía diabética que comprende la administración del vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención a un sujeto que lo necesite.

El sujeto puede, por ejemplo, haber sido diagnosticado de DMAE o estar en riesgo de padecer DMAE.

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

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

También se describe en el presente documento el uso del vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para fabricar un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno ocular mediado por el complemento.

En una realización, el trastorno se asocia con la sobreactividad del ciclo de retroalimentación del complemento C3b y/o la baja actividad del ciclo de degradación de C3b. En una realización, el trastorno es la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o la retinopatía diabética. En una realización preferida, el trastorno es DMAE, preferentemente DMAE seca.

También se describe en el presente documento el uso del vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de degeneración macular asociada a la edad (DMAE). En una realización preferida, la DMAE es DMAE seca.

También se describe en el presente documento el uso del vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de retinopatía diabética.

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

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

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

En una realización, el vector de VAA de la invención no comprende un genoma de VAA2 y una proteína de la cápside de VAA8, es decir, el vector de VAA de la invención no es un vector de VAA2/8.

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

Breve descripción de las figuras

Figura 1

Ciclos de retroalimentación (amplificación) y degradación (regulación negativa) de C3b de la ruta alternativa del complemento de vertebrados ("I" = Factor I; "H" = Factor H; "B" = Factor B; y "D" = Factor D).

Figura 2

Un gel de agarosa de digestos de restricción de FCI y FCloc. La banda de 1752 pb de FCI se excindió y se clonó en la estructura principal de pVAA-ABP-WPRE-bGHpA.

Figura 3

Inmunotransferencia de FCI (Figura 3A) y de GFP (Figura 3B). 3A: FCI aparece como una banda de 70 kDa (no reducida) y se expresó a las mismas tasas tras la transfección de ARPE-19 con pVAA.FCI o pVAA.FCloc. No se expresó FCI tras la transfección con pVAA. Se usó suero humano normal (SHN) al 10 % como un control positivo para la inmunotransferencia de FCI. 3B: Se analizó la eficacia de la transfección mediante cotransfección de células ARPE-19 con pCMV.GFP. GFP aparece como una banda de 30 kDa y la inmunotransferencia confirmó que las células se habían transfectado a eficacias similares.

Figura 4

Inmunotransferencia de FCI en sobrenadante de las líneas celulares HEK-293 y ARPE-19 transducidas con virus. 4A: El sobrenadante se cargó en condiciones no reductoras y se detectó el FCI con un anticuerpo monoclonal de

ratón para FCI humano (OX21, Thermo Fisher Scientific) y un anticuerpo anti-IgG de ratón en burro conjugado con HRP (Abcam). El FCI y el FCloc se expresaron en ambas líneas celulares. La transducción de las líneas celulares con VAA.GFP sirvió como un control negativo, mientras que 0,5 µg de FCI humano purificado en plasma (denominado "IFCpl" en el presente documento) (Comptech) sirvió como un control positivo. 4B: El sobrenadante se cargó en condiciones reductoras y se detectó el FCI con un antisuero de cabra para FCI humano (Comptech) y anticuerpo anti-IgG de cabra en conejo (molécula completa) - peroxidasa (Sigma). El FCI apareció a 80 kDa (proenzima), 50 kDa (procesado; cadena pesada) y 35 kDa (procesado; cadena ligera). VAA.GFP sirvió como un control negativo mientras que 0,5 µg de FCI humano purificado en plasma (Comptech) y suero humano normal al 10 % (denominado "SHN" en el presente documento) sirvieron como un control positivo. El FCI y el FCloc se expresaron en ambas líneas celulares.

Figura 5

Un resultado representativo de un ensayo de escisión de C3b. El carril 1 muestra C3b incubado solo con FCH. El carril 2 muestra C3b incubado con FCH y FCipl. C3b se degrada mediante FCipl a iC3b y C3dg. El carril 3 muestra C3b incubado con FCH y sobrenadante de HEK-293 transducido con VAA.IFC. El carril 4-5 muestra C3b incubado con FCH y FCI inmunoprecipitado (denominado "FCI IP") a partir de células ARPE-19 transducidas bien con VAA.FCI (carril 4) o con VAA.FCloc (carril 5). El carril 6-7 muestra C3b incubado con FCH y FCI inmunoprecipitado a partir de células HEK-293 transducidas bien con VAA.FCI (carril 6) o con VAA.FCloc (carril 7).

Figura 6

Inmunotransferencia de FCI secretado a partir de células ARPE-19 cultivadas en transpocillo. 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: El sobrenadante de ambos compartimentos se cargó en condiciones no reductoras y se realizó un análisis por transferencia de Western usando un monoclonal de ratón para FCI (Ap=compartimento apical y Bl=compartimento basolateral). Se demuestra que FCI se está expresando a partir de una monocapa confluyente de células y que las proteínas secretadas se detectan en ambos compartimentos. 6B: La tinción con Hoechst de los núcleos se realizó para confirmar la presencia de una monocapa de células (la tinción se realizó tras la recolección del sobrenadante).

Figura 7

Expresión de la proteína del FCI de las muestras agrupadas analizada mediante inmunotransferencia. El FCI se expresa a niveles detectables a todas las dosis y a partir de VAA.IFC y VAA.IFCoc. La actina β se cargó como un control de la carga. 7A: se cargaron 40 µg de lisado de proteína en condiciones reductoras y se detectó el FCI con un antisuero policlonal de cabra para el FCI humano. El FCI se detectó como 80 kDa (proenzima), 50 kDa (procesado; cadena pesada) y 35 kDa (procesado; cadena ligera). Estas bandas se corresponden con el tamaño esperado de FCI y confirman el procesamiento, es decir, la presencia de las cadenas pesada y ligera. 7B: También se cargó la misma cantidad de lisado de proteína para muestras de lisado de ojos inyectados con 10⁹cg/ojo de VAA.FCloc u ojos no inyectados. El FCI se detectó con un monoclonal de ratón para FCI (izquierda, gel no reductor) y antisuero de cabra para FCI (derecha, gel reductor). El gel no reductor (izquierda) detecta FCI como una banda a 75 kDa en animales inyectados y no se detectan bandas en los animales no inyectados. En el gel reductor (derecha), el FCI aparece como 80 kDa (proenzima), 50 kDa (procesado; cadena pesada) y 35 kDa (procesado; cadena ligera).

Figura 8

Análisis de expresión génica por PCRq.

Figura 9

Localización de hFCI en ojos inyectados con simulación (A-C), VAA.FCI (D-F) y VAA.FCloc (G-H). Las secciones retinianas se marcaron doblemente con fibronectina (A, D y G) y hFCI (B, E y H). Los núcleos se tiñeron con DAPI y se muestran en superposición (C, F e I). Escl: Esclerótica, EPR: Epitelio pigmentario retinal, SE: Segmento externo de fotorreceptores, SI: Segmento interno de fotorreceptores, CPE: Capa plexiforme externa, CCG: Capa de células ganglionares, CFN: Capa de fibra nerviosa, Aumento: 20X, Barra de escala: 50 µm.

Figura 10

Localización de hFCI en ojos inyectados con simulación (A-C) VAA.FCI (D-F): mayor aumento de EPR. Las secciones retinianas se marcaron doblemente con fibronectina (A y D) y hFCI (B y E). Los núcleos se tiñeron con DAPI y se muestran en superposición (C y F). Escl: Esclerótica, Bru: Membrana de Bruch, Co: Coriocapilares, EPR: Epitelio pigmentario retinal, MFI: Matriz de fotorreceptor interna. Aumento: 189X, Barra de escala: 10 µm. La tinción vesicular se representa con flechas, las microvellosidades se representan en el borde inferior del EPR con estrellas.

Figura 11

Localización de hFCI en ojos inyectados con simulación (A-C) VAA.FCI (D-F): mayor aumento de capas de fotorreceptores. Las secciones retinianas se marcaron doblemente con fibronectina (A y D) y hFCI (B y E). Los núcleos se tiñeron con DAPI y se muestran en superposición (C y F). MFI: Matriz de fotorreceptor interna, SE: Segmento externo, SI: Segmento interno, CNE: Capa nuclear externa. Aumento: 189X, Barra de escala: 10 µm.

Figura 12

Localización de hFCI en ojos inyectados con simulación (A-C) VAA.FCI (D-F): mayor aumento de la capa plexiforme externa (CPE). Las secciones retinianas se marcaron doblemente con fibronectina (A y D) y hFCI (B y E). Los núcleos se tiñeron con DAPI y se muestran en superposición (C y F). CNE: Capa nuclear externa, CNI: Capa nuclear interna. Aumento: 189X, Barra de escala: 10 µm. La tinción de células horizontales se representa con flechas.

Figura 13

Localización de hFCI en ojos inyectados con simulación (A-C) VAA.FCI (D-F): mayor aumento de la capa de células ganglionares (CCG). Las secciones retinianas se marcaron doblemente con fibronectina (A y D) y hFCI (B y E). Los núcleos se tiñeron con DAPI y se muestran en superposición (C y F). CPI: Capa plexiforme interna, CFN: Capa de fibra nerviosa. Aumento: 189X, Barra de escala: 10 µm.

Figura 14

Localización de hFCI en ojos inyectados con simulación (A-C), VAA.FCI (D-F) y VAA.FCloc (G-H). El epitelio pigmentario retinal completo se marcó doblemente con fibronectina (A, D y G) y hFCI (B, E y H). Aumento: 40X, Barra de escala: 30 µm.

Descripción detallada de la invención

Sistema del complemento

El sistema del complemento es una parte integral del sistema inmunológico humoral y está implicado en la inflamación de tejidos, la opsonización celular y la citólisis. Proporciona protección frente a microorganismos y media la eliminación de restos celulares exógenos y endógenos de los tejidos del hospedador.

La cascada del sistema del complemento está comprendida por cuatro rutas de activación. Todas las rutas finalmente terminan en la escisión central del factor C3 y en la generación de sus fragmentos activos C3a y C3b. C3a es la anafilotoxina que desencadena un intervalo 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 los fragmentos activados de C3 (C3b e iC3b) realiza tres funciones principales: (i) la eliminación de restos celulares mediante células fagocíticas (por ejemplo, macrófagos o células de la microglía) y la estimulación del sistema inmunológico adaptativo (linfocitos B y linfocitos T); (ii) la amplificación de la activación del complemento mediante la formación de C3 convertasa unida a la superficie; y (iii) el ensamblaje de C5 convertasa.

El ensamblaje de C5 convertasa es responsable de la escisión de C5, lo que da como resultado la formación del complejo de ataque citolítico a la membrana (MAC, del inglés *membrane attack complex*) 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 innata del complemento mantiene y promueve la función de mecanismos de aguas abajo del sistema inmunológico que protege la integridad del tejido del hospedador. En su conjunto, la activación de la ruta del sistema del complemento da como resultado una respuesta proinflamatoria, incluyendo 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 de forma eficaz por la acción coordinada de moléculas reguladoras del complemento (MRC) solubles y asociadas a la membrana. Los reguladores solubles del complemento, tales como el inhibidor de C1, el inhibidor de anafilotoxinas, la proteína de unión a C4b (C4BP, del inglés *C4b binding protein*), el factor del complemento H(FCH), el factor del complemento I (FCI), la clusterina y la vitronectina, restringen la acción del complemento en tejidos humanos en diferentes sitios de la reacción en cascada. Además, cada célula individual se protege frente al ataque del complemento homólogo mediante proteínas de la superficie, tales como el receptor del complemento 1 (RC1, CD35), la proteína del cofactor de membrana (CD46) y las proteínas ancladas por glucosilfosfatidilinositol, tales como el factor de aceleración de la desintegración (CD55) o la molécula CD59. Cabe destacar que, las células hospedadoras y los tejidos protegidos inadecuadamente del ataque del complemento se pueden someter a lisis celular por vecindad.

La presente divulgación se refiere al tratamiento o a la prevención de un trastorno ocular mediado por el complemento. Por ejemplo, el trastorno mediado por el complemento puede ser un trastorno asociado a un defecto

en la regulación de la ruta alternativa, y en particular, a la sobreactividad del ciclo de retroalimentación del complemento C3b y/o a la baja actividad del ciclo de degradación de C3b.

En una realización, antes de la administración del vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención, el sujeto tiene bajos niveles (por ejemplo, inferiores a los niveles normales) de actividad del Factor I, por ejemplo, bajos niveles de actividad del Factor I en el ojo y/o bajos niveles de actividad del Factor I en suero. El nivel de actividad del Factor I por debajo de lo normal puede deberse a la expresión por debajo de lo normal del Factor I que funciona con normalidad, o al menos a la expresión parcial (por ejemplo, heterocigótica) (a niveles normales o por debajo del normal) de una variante no funcional o subfuncional del Factor I. (Tal sujeto puede llevar una o más copias de un SNP asociado a DMAE, por ejemplo, el sujeto puede ser homocigótico o heterocigótico para una de las variantes poco comunes del Factor I tratadas en detalle a continuación). De este modo, el sujeto puede tener una baja concentración (por ejemplo, una concentración inferior a la normal) de Factor I en el ojo y/o en el 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 a la proporcionada por 30-40 µg/ml de Factor I en el suero del sujeto. De este modo, en un sujeto con baja actividad de Factor I, la actividad del Factor I en el suero puede corresponder a menos de 30 µg/ml y a más de 0 µg/ml de Factor I, tal como 0-20 o 0-10 µg/ml (siento estos los intervalos de concentración de Factor I en suero que puede abarcar un sujeto que tiene una baja concentración de Factor I).

De este modo, el sujeto a tratar mediante la presente invención puede padecer un trastorno ocular mediado por el complemento tal como DMAE, más en particular, DMAE seca (por ejemplo, caracterizada por atrofia geográfica) o puede estar en riesgo de desarrollar tal trastorno. Por ejemplo, el sujeto puede ser homocigótico o heterocigótico susceptible para uno o más SNP asociados con el trastorno mediado por el complemento.

En una realización, el sujeto está en riesgo de desarrollar DMAE. Por ejemplo, el sujeto puede ser homocigótico o heterocigótico susceptible para uno o más SNP asociados con DMAE, por ejemplo, las mutaciones poco comunes en el Factor I asociado a la DMAE avanzada que comúnmente dan como resultado niveles reducidos de Factor I en suero (Kavanagh et al., Hum Mol Genet. 1 de julio de 2015; 24(13):3861-70). En particular, el sujeto puede llevar una o dos copias de una o más de las siguientes variantes 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 puede comprender adicionalmente la determinación de si el sujeto está en riesgo de desarrollar un trastorno mediado por el complemento (por ejemplo, DMAE), por ejemplo, determinando si el sujeto es homocigótico o heterocigótico susceptible para uno o más SNP asociados con el trastorno mediado por el complemento (por ejemplo, determinando si el sujeto es homocigótico o heterocigótico susceptible para una o más de las variantes poco comunes del Factor I asociadas a DMAE enumeradas anteriormente).

Como alternativa, el sujeto puede tener un nivel normal de actividad o de concentración del Factor I endógeno, por ejemplo, en el ojo y/o en el suero y/o puede no llevar una variante poco común del alelo del Factor I.

En una realización, la administración del vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención aumenta de este modo el nivel de actividad de inactivación de C3b y degradación de iC3b en el ojo del sujeto. En otra realización, la administración del vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención aumenta de este modo el nivel de actividad de inactivación de C3b y degradación de iC3b en el ojo del sujeto a un nivel que supere el nivel normal en el ojo. Más particularmente, el nivel de actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b está aumentado en el EPR del ojo.

Se apreciará que la actividad de inactivación de C3b y la degradación de iC3b en el sujeto tras la expresión del Factor I o el fragmento del mismo a partir del vector de VAA de la invención puede comprender la actividad de inactivación de C3b y la degradación de iC3b del Factor I endógeno del sujeto (es decir, el Factor I del sujeto no producido mediante la expresión a partir del vector VAA), y la actividad de inactivación de C3b y degradación de iC3b producida por la expresión a partir del vector de VAA de la invención, tal como el nivel total de actividad de inactivación de C3b y la actividad de degradación de iC3b en el sujeto superan un nivel normal.

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

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

Por ejemplo, el nivel de actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b en el sujeto, por ejemplo en el ojo, puede estar aumentado a un nivel que es un 5-100 %, un 5-80 %, un 5-60 %, un 5-40 %, un 5-20 %, un 10-100

%, un 10-80 %, un 10-60 %, un 10-40 %, un 10-20 %, un 15-100 %, un 15-80 %, un 15-60 %, un 15-40 %, un 15-20 %, un 20-100 %, un 20-80 %, un 20-60 %, un 20-40 %, un 25-100 %, un 25-80 %, un 25-60 % o un 25-40 % por encima del nivel normal.

En una realización, la administración del vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención no aumenta de manera 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 de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la invención no aumenta de manera 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.

Como también se describe en el presente documento, antes de la administración del vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de la divulgación, el sujeto puede tener bajos niveles (por ejemplo, inferiores a los niveles normales) de actividad del Factor H, por ejemplo, bajos niveles del Factor H en el ojo y/o bajos niveles del Factor H en suero. Para un sujeto humano, el nivel normal de Factor H puede ser aproximadamente 200-500 µg/ml en el suero del sujeto. De este modo, en un sujeto con bajos niveles de Factor H, los niveles en el suero pueden ser inferiores de 200 µg/ml y mayores de 0 µg/ml, tales como 0-100 µg/ml. Como alternativa, el sujeto puede tener un nivel normal de Factor H endógeno, por ejemplo, en el ojo y/o en el suero.

Factor I

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

El Factor I es una serina proteasa que circula en un estado de tipo 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-glucosilado que consiste en dos cadenas polipeptídicas enlazadas mediante un único enlace disulfuro. La cadena pesada (50 kDa) comprende una región de N-terminal; un dominio del complejo de ataque de membrana del FI (FIMAC); un dominio de tipo CD5 o un dominio de receptor de fagocito rico en cisteína (SRCR, del inglés *scavenger receptor cysteine-rich*); dos dominios de receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLr, del inglés *low-density lipoprotein receptor*); y una región de C-terminal de función desconocida que es un lugar de variabilidad de secuencia entre especies (Roversi *et al.*; como anteriormente). La cadena ligera (38 kDa) contiene el dominio serina proteasa (SP) con los restos catalíticos conservados (Goldberger *et al.*; J Biol Chem 1987, 262(21):10065-10071).

El Factor I inactiva C3b mediante su escisión en iC3b, C3d y C3d,g y, de manera análoga, C4b en C4c y C4d. Para realizar de manera apropiada sus funciones, el Factor I requiere la presencia de proteínas de cofactor tales como la proteína de unión a C4b (C4BP), el factor del complemento H (FCH), el receptor del complemento 1 (RC1/CD35) y la proteína cofactor de membrana (PCM/CD46) (Degn *et al.*; Am J Hum Genet 2011, 88(6):689-705).

iC3b es incapaz de asociarse al 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 tanto, una vez que C3b se ha escindido en iC3b, no tiene lugar ninguna iniciación de la ruta alternativa ni la activación de la cascada del complemento terminal.

iC3b es capaz de proporcionar una acción proinflamatoria mediante la unión a, y la activación, del receptor del complemento 3 (RC3)(CD11b/CD18) sobre leucocitos polimorfonucleares (en su mayoría, neutrófilos), células NK y fagocitos mononucleares tales como macrófagos.

El Factor I es capaz de transformar iC3b en C3d,g mediante actividad proteasa que requiere el cofactor, RC1. C3d,g es incapaz de unirse a CR3. Dado que la reacción de iC3b con el receptor del complemento RC3 es un mecanismo principal mediante el cual la activación del complemento desencadena la inflamación, la degradación de iC3b a C3d,g es esencial para reducir la inflamación inducida por el complemento (Lachmann (2009), Adv. Immunol., 104:115-149).

La única capacidad del Factor I tanto para promover la escisión de C3b a iC3b así como para acelerar la degradación de iC3b - combinado con su relativamente baja concentración en suero humano, con implicaciones para la cantidad requerida a administrar para la eficacia terapéutica - lo hace una diana particularmente ventajosa.

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 fragmento del mismo puede ser capaz de escindir C3b en iC3b.

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

En una realización preferida el polipéptido del Factor I o un fragmento del mismo es capaz de escindir C3b a iC3b y transformar iC3b en C3dg.

El fragmento de Factor I puede mantener al menos un 50 %, un 60 %, un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 % o un 100 % de la actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b del Factor I natural. La actividad de inactivación de C3b y de degradación de iC3b del fragmento del Factor I y del Factor I natural, se pueden determinar usando cualquier método adecuado conocido por los expertos en la materia. 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 conglutinantes para la actividad de FI se describen en Lachmann PJ y Hobart MJ (1978) "Complement Technology" en Handbook of Experimental Immunology, 3ª edición, Ed DM Weir Blackwells Scientific Publications, Capítulo 5A p17. Una descripción más detallada, que también incluye un ensayo proteolítico, es dada por Harrison RA (1996) en "Weir's Handbook of Experimental Immunology", 5ª Edición Eds; Herzenberg Leonore A'Veir DM, Herzenberg Leonard A y Blackwell C Blackwells Scientific Publications Capítulo 75 36-37. El ensayo conglutinante es altamente sensible y se puede usar para detectar tanto el primer (doble) corte que convierte C3b fijado en iC3b y adquirir la reactividad con conglutinina; como para detectar el corte final para C3dg partiendo de iC3b fijado y buscando la pérdida de reactividad con conglutinina. El ensayo hemolítico se usa para la conversión de C3b a iC3b, y el ensayo proteolítico detecta todos los cortes.

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

Un ejemplo de proteína de Factor I humana es la proteína de Factor I humana que tiene el número de registro de UniProtKB P05156. Esta secuencia ejemplificada es de 583 aminoácidos de longitud (mostrada como SEQ ID NO: 1) cuyos aminoácidos 1 a 18 forman una secuencia de señal.

En una realización, la secuencia de aminoácidos del Factor I es la secuencia mostrada como 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 LECLHPGTFK
LNNGTCTAEG KFSVSLKHGN TDSEGIVEVK LVDQDKTMFI CKSSWSMREA
NVACLDLGFQ QGADTQRRFK LSDLSINSTE CLHVHCRGLE TSLAECTFTK
RRTMGYQDFA DVVCYTQKAD SPMDDFFQCV NGKYISQMKA CDGINDCGDQ
SDELCKKACQ GKGFFHCKSGV CIPSQYQCNG EVDCITGEDE VGCAGFASVT
QEETEILTAD MDAERRRIKS LLPKLSCGVK NRMHIRRKRI VGGKRAQLGD
LPWQVAIKDA SGITCGGIYI GGCWILTAH CLRASKTHRY QIWTTVVDWI
HPDLKRIVIE YVDRIIFHEN YNAGTYQNDI ALIEMKKDGN KKDCELPRSI
PACVPWSPYL FQPNDDTCIVS GWGREKDNER VFSLQWGEVK LISNCSKFYK
NRFYEKEMEC AGTYDGSIDA CKGDSGGPLV CMDANNVTYV WGVVSWGENC
GKPEFPGVYT KVANYFDWIS YHVGRPFISQ YNV

```

(SEQ ID NO: 1)

En una realización, la secuencia de aminoácidos del Factor I es la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 9, que se corresponde con el número de registro del NCBI NP_000195. 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: 9.

```

MKLLHVFLLF LCFHLRFCKV TYTSQEDLVE KKCLAKKYTH LSCDKVFCQP WQRCIEGTCV
CKLPYQCPKN GTAVCATNRR SFPTYCQQKS LECLHPGTFK LNNGTCTAEG KFSVSLKHGN
TDSEGIVEVK LVDQDKTMFI CKSSWSMREA NVACLDLGFQ QGADTQRRFK LSDLSINSTE
CLHVHCRGLE TSLAECTFTK RRTMGYQDFA DVVCYTQKAD SPMDDFFQCV NGKYISQMKA
CDGINDCGDQ SDELCKKACQ GKGFFHCKSGV CIPSQYQCNG EVDCITGEDE VGCAGFASVA
QEETEILTAD MDAERRRIKS LLPKLSCGVK NRMHIRRKRI VGGKRAQLGD LPWQVAIKDA
SGITCGGIYI GGCWILTAH CLRASKTHRY QIWTTVVDWI HPDLKRIVIE YVDRIIFHEN
YNAGTYQNDI ALIEMKKDGN KKDCELPRSI PACVPWSPYL FQPNDDTCIVS GWGREKDNER
VFSLQWGEVK LISNCSKFYK NRFYEKEMEC AGTYDGSIDA CKGDSGGPLV CMDANNVTYV
WGVVSWGENC GKPEFPGVYT KVANYFDWIS YHVGRPFISQ YNV

```

(SEQ ID NO: 9)

Un ejemplo de una secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I es la secuencia de nucleótidos que tiene el número de registro del 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 registro del 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.

```

atgaagcttc ttcattgttt cctgttattt ctgtgcttcc acttaagggt ttgcaagggtc
acttatacat ctcaagagga tctggtggag aaaaagtgc tagcaaaaaa atatactcac
ctctcctgcg ataaagtctt ctgccagcca tggcagagat gcattgaggg cacctgtgtt
tgtaaaactac cgtatcagtg cccaaagaat ggcactgcag tgtgtgcaac taacaggaga
agcttcccaa catactgtca acaaaagagt ttggaatgtc ttcattccag gacaaagttt
ttaaataacg gaacatgcac agccgaagga aagtttagtg tttccttgaa gcatggaaat
acagattcag aggggaatagt tgaagtaaaa cttgtggacc aagataagac aatgttcata
tgcaaaagca gctggagcat gaggaagcc aacgtggcct gccttgacct tgggtttcaa
caaggtgctg atactcaaag aaggtttaag ttgtctgac tctctataaa ttccactgaa
tgtctacatg tgcattgccg aggattagag accagtttgg ctgaatgtac ttttactaag
agaagaacta tgggttacca ggatttcgct gatgtggttt gttatacaca gaaagcagat
tctccaatgg atgacttctt tcagtgtgtg aatgggaaat acatttctca gatgaaagcc
tgtgatggta tcaatgattg tggagaccaa agtgatgaac tgtgttgtaa agcatgccaa
ggcaaaaggct tccattgcaa atcgggtgtt tgcattccaa gccagtatca atgcaatggt
gaggtggact gcattacagg ggaagatgaa gttggctgtg caggctttgc atctgtggct
caagaagaaa cagaaatttt gactgctgac atggatgcag aaagaagacg gataaaatca
ttattaccta aactatcttg tggagttaaa aacagaatgc acattcgaag gaaacgaatt
gtgggaggaa agcgagcaca actgggagac ctcccatggc aggtggcaat taaggatgcc
agtggaaatca cctgtggggg aatttatatt ggtggctgtt ggattctgac tgctgcacat
tgtctcagag ccagtaaaac tcatcgttac caaatatgga caacagtagt agactggata
caccocgacc ttaaactgat agtaattgaa tacgtggata gaattatttt ccatgaaaac
tacaatgcag gcacttacca aaatgacatc gctttgattg aaatgaaaaa agacggaaac
aaaaaagatt gtgagctgcc tcgttccatc cctgctgtg tcccttggtc tccttaccta
ttccaacctc atgatacatg catcgtttct ggctggggac gagaaaaaga taacgaaaga
gtcttttcac ttcagtgggg tgaagttaaa ctaataagca actgctctaa gttttacgga
aatcgtttct atgaaaaaga aatggaatgt gcaggtacat atgatgggtc catcgatgcc
tgtaaaaggg actctggagg ccccttagtc tgtatggatg ccaacaatgt gacttatgtc
tggggtgttg tgagttgggg ggaactgt ggaaaaccag agttcccagg tgtttacacc
aaagtggcca attattttga ctggattagc taccatgtag gaaggccttt tatttctcag
tacaatgtat aa

```

5 (SEQ ID NO: 2)

Las secuencias de nucleótidos usadas en la invención pueden estar optimizadas por codón. La optimización por codón se ha descrito anteriormente en los documentos WO 1999/041397 y WO 2001/079518. Diferentes células difieren en su uso de codones particulares. Este sesgo de codones se corresponde con un sesgo en la abundancia
10 relativa de los ARNt particulares en el tipo celular. Alterando los codones en la secuencia para que se adapten para coincidir con la abundancia relativa de los correspondientes ARNt, es posible aumentar la expresión. Por la misma razón, es posible disminuir la expresión eligiendo deliberadamente los codones para los que se sabe que los correspondientes ARNt son poco comunes en el tipo celular particular. De este modo, está disponible un grado
15 adicional de control de la traducción.

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
 CAGCCTTGGCAGCGGTGCATCGAGGGCACCTGCGTGTGCAAGCTGCCCTTACCAGTGCCCAAAGAACGGCACC
 GCCGTGTGCGCCACAAATCGGAGATCTTTTCCAACATATTGCCAGCAGAAGAGCCTGGAGTGTCTGCACCCC
 GGCACCAAGTTCTTGAACAATGGCACCTGCACAGCCGAGGGCAAGTTTCTGTGAGCCTGAAGCACGGCAAC
 ACAGATAGCGAGGGCATCGTGGAGGTGAAGCTGGTGGACCAGGATAAGACCATGTTTCTGTGTAAGAGCTCC
 TGGTCCATGAGGGAGGCAAACGTGGCATGCCCTGGATCTGGGATTCCAGCAGGGAGCAGACACACAGAGGCGC
 TTTAAGCTGTCCGACCTGTCTATCAATAGCACCGAGTGCCTGCACGTGCACTGTAGGGGCTGGAGACATCC
 CTGGCAGAGTGCACCTTCACAAAGCGGAGAACCATGGGGTACCAGGACTTTGCCGACGTGGTGTGTATACC
 CAGAAGGCCGATAGCCCCATGGACGATTTCTTTTCACTGCGTGAACGGCAAGTATATCTCCCAGATGAAGGCC
 TGCGACGGCATCAATGACTGTGGCGATCAGTCTGACGAGCTGTGCTGTAAGGCCCTGTGAGGGCAAGGGCTTC
 CACTGCAAGAGCGGCGTGTGCATCCCTTCCCAGTACCAGTGCACCGGCGAGGTGGATTGTATCACAGGAGAG
 GACGAAGTGGGATGCGCAGGATTTGCATCTGTGGCACAGGAGGAGACAGAGATCCTGACAGCCGACATGGAT
 GCCGAGAGGCGCGGATCAAGTCTCTGCTGCCCTAAGCTGAGCTGTGGCGTGAAGAATCGGATGCACATCAGA
 AGGAAGCGCATCGTGGGAGGCAAGAGGGCACAGCTGGGCGATCTGCCATGGCAGGTGGCCATCAAGGACGCC
 TCTGGCATCACCTGCGGCGGCATCTACATCGGAGGATGTTGGATCCTGACCGCAGCACACTGCCGTGAGAGCA
 AGCAAGACACACAGGTATCAGATCTGGACCACAGTGGTGGATTGGATCCACCCAGACCTGAAGAGAATCGTG
 ATCGAGTACGTGGATAGGATCATCTTTTACGAGAACTACAATGCCGGCACATATCAGAACGACATCGCCCTG
 ATCGAGATGAAGAAGGATGGCAATAAGAAGGACTGTGAGCTGCCAGATCCATCCCTGCATGCGTGCCATGG
 AGCCCTATCTGTTCCAGCCCAACGATACCTGCATCGTGTCCGGATGGGGAAGGGAGAAGGACAATGAGCGG
 GTGTTTTCTCTGCAGTGGGGCGAGGTGAAGCTGATCTCCAACCTGTTCTAAGTTCTACGGCAATAGGTTTTAT
 GAGAAGGAGATGGAGTGCGCCGGCACCTACGATGGCAGCATCGACGCTGTAAGGGCGATTCCGGAGGACCA
 CTGGTGTGCATGGACGCAAACAATGTGACATACGTGTGGGGAGTGGTGTCTTGGGGAGAGAAGTGGCGCAAG
 CCAGAGTTCCCCGGCGTATATACCAAGGTGGCCAATTATTTTGTATTGGATTTCCTACCACGTGGCAGGCCC
 TTTATTTCCCAGTATAATGTCTAA

(SEQ ID NO: 8)

5 La secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o un fragmento del mismo puede, por ejemplo, comprender una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 o 8, en donde la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos mantiene 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, por ejemplo, comprender una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con la secuencia mostrada como las posiciones 55 a 1752 de la SEQ ID NO: 2 o 8, en donde la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos mantiene 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 un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o 9, en donde la secuencia de aminoácidos mantiene 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 un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con la secuencia mostrada como las posiciones 19 a 583 de la SEQ ID NO: 1 o 9, en donde la secuencia de aminoácidos mantiene 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 la forma de una proteína purificada. Por consiguiente, los inventores han diseñado una forma de modular el sistema del complemento, por ejemplo, para facilitar tratamiento de degeneración macular asociada a la edad (DMAE), administrando Factor I en la forma de un vector de VAA que comprende una secuencia de nucleótidos de codifica el Factor I. El vector de VAA se puede administrar a un sitio de interés, por ejemplo, el ojo, para facilitar la traducción *in situ* del polipéptido del Factor I.

Factor H

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

Es una glucoproteína 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 ruta alternativa del sistema del complemento.

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

- 10 El Factor H está hecho de hasta 20 módulos de proteína de control del complemento (PCC) (también denominadas repeticiones consenso cortas o dominios sushi) conectados entre sí mediante enlazadores cortos (de entre tres y ocho restos de aminoácidos) y dispuestos de una forma extendida de cabeza a cola. Cada uno de los módulos de PCC consiste en aproximadamente 60 aminoácidos con cuatro restos de cisteína unidos por disulfuro en una disposición 1-3 2-4. un núcleo hidrófobo creado alrededor de un resto de triptófano casi invariante. Los módulos de PCC se numeran desde 1-20 (desde el extremo N-terminal de la proteína). Las PCC 1-4 y las PCC 19-20 interactúan con C3b mientras que las PCC 7 y las PCC 19-20 se unen a los GAG y al ácido siálico (Schmidt *et al.*; 2008; Journal of Immunology 181 (4): 2610-9).

- 20 Se ha demostrado que la terapia génica que usa el Factor H puede aliviar patologías de tipo DMAE inducidas en ratones (Cashman *et al.* (2015) J. Gene Med. 17: 229-243). Los ratones se coinyectaron por vía subretiniana con: (i) un vector de adenovirus que expresa el componente del complemento C3, que ha demostrado previamente recapitular muchas características patológicas de la DMAE humana; y (ii) un vector de adenovirus que expresa Factor H. En relación con los animales de control que reciben GFP en lugar de Factor H, los ratones transducidos con Factor H presentaron un 91 % de reducción en la proliferación de células endoteliales y un 69 % de atenuación de la atrofia del EPR. La electroretinografía demostró una función retiniana mejorada en ratones que reciben Factor H, y la inmunohistoquímica de rodopsina y RPE65 fue consistente con el rescate de fotorreceptores y EPR en tales animales.

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

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

En una realización de la divulgación, el Factor H es Factor H humano.

- 40 Un ejemplo de proteína de Factor H humana es la proteína de Factor H humana que tiene el número de registro de UniProtKB P08603. Esta secuencia ejemplificada es de 1231 aminoácidos de longitud (mostrada como SEQ ID NO: 3) cuyos aminoácidos 1 a 18 forman una secuencia de señal.

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

```

MRLAKIICL MLWAICVAED CNELPPRRNT EILTGSWSDQ TYPEGTQAIY
KCRPGYRSLG NVIMVCRKGE WVALNPLRKC QKRPCGHPGD TPFGTFTLTG
GNVFEYGVKA VYTCNEGYQL LGEINYRECD TDGWTNDIPI CEVVKCLPVT
APENGKIVSS AMEPDREYHF GQAVRFVCNS GYKIEGDEEM HCSDDGFWSK
EKPKCVEISC KSPDVINGSP ISQKIIYKEN ERFQYKCNMG YEYSERGDV
CTESGWRPLP SCEEKSCDNP YIPNGDYSP LRIKHRTGDEI TYQCRNGFYP
ATRGNTAKCT STGWIPAPRC TLKPCDYPDI KHGGLYHENM RRPYFPVAVG
KYYSYYCDEH FETPSGSYWD HIICTQDGWS PAVPCLRKCY FPYLENGYNQ
NYGRKFVQ GK SIDVACHPGY ALPKAQTTVT CMENGWSPTP RCIRVKTC SK
SSIDIENGF I SESQYTYALK EKAKYQCKLG YVTADGETSG SITCGKDGWS
AQPTCIKSCD IPVFMNARTK NDFTWFKLND TLDYEC HDGY ESNTGSTTGS
IVCGYNGWSD LPICYERECE LPKIDVHLVP DRKKDQYKVG EVLKF SCKPG
FTIVGPNSVQ CYHFGLS PDL PICKEQVQSC GPPPELLNGN VKEKTKEEYG
HSEVVEYYCN PRFLMKGP NK IQCVDGEWTT LPVCIVEEST CGDIPELEHG
WAQLSSPPY YGDSVEFNCS ESFTMIGHRS ITCIHGVWTQ LPQCVAIDKL
KKCKSSNLII LEEHLKNKKE FDHNSNIRYR CRGKEGWIHT VCINGRWDPE
VNCSSMAQIQL C P P P P QIPNS HNMTTTLN YR DGEKVS V L C Q ENYLIQEGEE
ITCKDGRWQS IPLCVEKIPC SQPPQIEHGT INSSRSSQES YAHGTKLSYT
CEGGFRIS E E NETTCYMGKW SSPPQCEGLP CKSPPEISHG VVAHMSDSYQ
YGEEV TYKCF EGF GIDGPAI AKCLGEKWSH PPSCIKT DCL SLPSFENAIP
MGEKKDVYKA GEQV TYTCAT YYKMDGASNV TCINSRWTGR PTCRDTSCVN
PPTVQ NAYIV SRQMSKYPSG ERVRYQCRSP YEMFGDEEVM CLNGNWTEPP
QCKDSTGKCG PPPPIDNGDI TSFPLSVYAP ASSVEYQCQN LYQLEGNKRI
TCRNGQWSEP PKCLHPCVIS REIMENYNIA LRWTAKQKLY SRTGESVEFV
CKRGYRLSSR SHTLR TTCWD GKLEYPTCAK R

```

(SEQ ID NO: 3)

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

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

```

atgagacttc tagcaaagat tatttgccct atgttatggg ctatttgtgt agcagaagat
tgcaatgaac ttccctccaag aagaaataca gaaattctga caggttcctg gtctgaccaa
acatatccag aaggcaccga ggctatctat aaatgccgcc ctggatatag atctcttgga
aatgtaataa tggatgacag gaaggagaa tgggttgctc ttaatccatt aaggaaatgt
cagaaaaggc cctgtggaca tcctggagat actccttttg gtacttttac cottacagga
ggaaatgtgt ttgaatatgg tgtaaaagct gtgtatacat gtaatgagg gtatcaattg
ctaggtgaga ttaattaccg tgaatgtgac acagatggat ggaccaatga tattcctata
tgtgaagttg tgaagtgttt accagtgaca gcaccagaga atggaaaaat tgtcagtagt
gcaatggaac cagatcgga ataccat ttt ggacaagcag tacggtttgt atgtaactca
ggctacaaga ttgaaggaga tgaagaaatg cattgttcag acgatgggtt ttggagtaaa
gagaaaccaa agtgtgtgga aatttcacgc aaatccccag atgttataaa tggatctcct
atatctcaga agattatttta taaggagaat gaacgatttc aatataaatg taacatgggt
tatgaataca gtgaaagagg agatgctgta tgcactgaat ctggatggcg tccgttgccct
tcatgtgaag aaaaatcatg tgataatcct tatattccaa atggtgacta ctacacctta
aggattaaac acagaactgg agatgaaatc acgtaccagt gtagaaatgg tttttatcct
gcaaccgggg gaaatacagc aaaatgcaca agtaactggct ggatacctgc tccgagatgt
accttgaaac cttgtgatta tccagacatt aaacatggag gtctatatca tgagaatatg
cgtagaccat actttccagt agctgtagga aaatattact cctattactg tgatgaacat
tttgagactc cgtcaggaag ttactgggat cacattcatt gcacacaaga tggatggctcg

```

10

ES 2 666 204 T3

```

ccagcagtac catgcctcag aaaatgttat tttccttatt tggaaaatgg atataatcaa
aatcatggaa gaaagtttgt acagggtaaa tctatagacg ttgcctgcc a toctggctac
gctcttccaa aagcgcagac cacagttaca tgtatggaga atggctgggtc toctactccc
agatgcattc gtgtcaaaac atgttccaaa tcaagtatag atattgagaa tggggtttatt
tctgaatctc agtatacata tgccttaaaa gaaaaagcga aatatcaatg caaactagga
tatgtaacag cagatgggtga aacatcagga tcaattacat gtgggaaaga tggatgggtca
gctcaaccca cgtgcattaa atcttgtgat atcccagtat ttatgaatgc cagaactaaa
aatgacttca catgggtttaa gctgaatgac acattggact atgaatgcc a tgatgggttat
gaaagcaata ctggaagcac cactgggtcc atagtgtgtg gttacaatgg ttgggtctgat
ttacccatata gttatgaaa agaatgcgaa cttcctaaaa tagatgtaca cttagttcct
gatcgcaaga aagaccagta taaagttgga gaggtgttga aattctcctg caaaccagga
tttacaatag ttggacctaa ttccgttcag tgctaccact ttggattgtc toctgacctc
ccaatatgta aagagcaagt acaatcatgt ggtccacctc ctgaactcct caatgggaat
gttaaggaaa aaacgaaaga agaatatgga cacagtgaag tgggtggaata ttattgcaat
cctagatttc taatgaagg acctaataaa attcaatgtg ttgatggaga gtggacaact
ttaccagtgt gtattgtgga ggagagtacc tgtggagata tacctgaact tgaacatggc
tgggccacagc tttcttcccc tcttatttac tatggagatt cagtgggaatt caattgtctca
gaatcattta caatgattgg acacagatca attacgtgta ttcattggagt atggacctaa
cttccccagt gtgtggcaat agataaactt aagaagtga aatcatcaaa ttttaattata
cttgaggaa atttaaaaaa caagaaggaa ttcgatcata attctaact aaggtacaga
tgtagaggaa aagaaggatg gatacacaca gtctgcataa atggaagatg ggatccagaa
gtgaactgct caatggcaca aatacaatta tgccacctc cacctcagat tcccaattct
cacaatatga caaccacact gaattatcgg gatggagaaa aagtatctgt tctttgccaa
gaaaattatc taattcagga aggagaagaa attacatgca aagatggaag atggcagtca
ataccactct gtgttgaaaa aattccatgt tcacaaccac ctcagataga acacggaacc
attaattcat ccaggtcttc acaagaaagt tatgcacatg ggactaaatt gagttatact
tgtgagggtg gtttcaggat atctgaagaa aatgaaacaa catgctacat gggaaaatgg
agttctccac ctcagtgtga aggccttcc tgtaaatctc cacctgagat ttctcatgggt
gttgtagctc acatgtcaga cagttatcag tatggagaag aagttacgta caaatgtttt
gaaggttttg gaattgatgg gcctgcaatt gcaaaatgct taggagaaaa atggtctcac
cctccatcat gcataaaaa agattgtctc agtttaccta gctttgaaaa tgccataccc
atgggagaga agaaggatgt gtataaggcg ggtgagcaag tgacttacac ttgtgcaaca
tattacaaaa tggatggagc cagtaatgta acatgcatta atagcagatg gacagggaag
ccaacatgca gagacacctc ctgtgtgaat ccgccacag taaaaaatgc ttatatagt
tcgagacaga tgagtaaaaa tccatctggt gagagagtac gttatcaatg taggagccct
tatgaaatgt ttggggatga agaagtgatg tgtttaaatg gaaactggac ggaaccacct
caatgcaaaag attctacagg aaaatgtggg cccctccac ctattgacaa tggggacatt
acttcattcc cgttgtcagt atatgctcca gttcatcag ttgagtacca atgccagaac
ttgtatcaac ttgagggtta caagcgaata acatgtagaa atggacaatg gtcagaacca
ccaaaatgct tacatccgtg tgtaatatcc cgagaaatta tggaaaatta taacatagca
ttaaggtgga cagccaaaca gaagctttat tcgagaacag gtgaatcagt tgaatttgtg
tgtaaacggg gatatcgtct ttcacacatg tctcacacat tgcgaacaac atgttgggat
gggaaaactgg agtatccaac ttgtgcaaaa agatag

```

(SEQ ID NO: 4)

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 un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 4, en donde la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos mantiene sustancialmente una actividad funcional de la proteína representada por la SEQ ID NO: 3.

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 un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con la secuencia mostrada como las posiciones 55 a 3696 de la SEQ ID NO: 4, en donde la proteína codificada por la secuencia de nucleótidos mantiene sustancialmente una actividad funcional de la proteína representada por la SEQ ID NO: 3.

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

La secuencia de nucleótidos que codifica el Factor H de la presente divulgación de la invención puede, por ejemplo, codificar una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con la secuencia mostrada como las posiciones 19 a 1231 de la SEQ ID NO: 3, en donde la secuencia de aminoácidos mantiene sustancialmente una actividad funcional de la proteína representada por la SEQ ID NO: 3.

Factor D

El factor del complemento D (Factor D, FCD) está implicado en la ruta alternativa del complemento del sistema del complemento. Sirve para escindir el factor B al factor Bb y Ba.

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

La cascada alternativa de activación del complemento se inicia mediante la hidrólisis espontánea de C3, que es abundante en el plasma sanguíneo. La "escisión/activación basal" tiene lugar mediante la escisión espontánea del enlace tioéster en C3 para formar C3(H₂O).

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

Un vector de VAA descrito en el presente documento puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-Factor D.

El anticuerpo anti-factor D puede unirse al factor D y reducir o evitar una actividad funcional del Factor D. Por ejemplo, el anticuerpo anti-factor D puede reducir o evitar la unión del Factor D al Factor B y/o la escisión por Factor D del Factor B.

Los anticuerpos anti-Factor D adecuados son conocidos en la materia. Tales anticuerpos incluyen, pero sin limitación, lampalizumab.

Componente del complemento 5

El componente del complemento 5 (C5) es el quinto componente del complemento, que desempeña un importante papel en los procesos inflamatorios y citolíticos. C5 está compuesto de cadenas alfa y beta de polipéptidos que están unidas mediante un puente disulfuro.

C5 se escinde mediante la proteasa C5-convertasa en los fragmentos del componente del complemento 5a (C5a) y C5b. C5b es importante en los últimos eventos de la cascada del complemento, mientras que C5a actúa como un péptido altamente inflamatorio. El origen de C5 es generalmente de hepatocitos, pero su síntesis también se puede hallar en macrófagos y esto puede provocar aumentos locales de C5a. C5a tiene propiedades quimiotácticas y anafilóticas, es esencial en la inmunidad innata pero también está ligado a la inmunidad adaptativa. El aumento de la producción de C5a está conectado a una serie de enfermedades inflamatorias.

C5a es una anafilotoxina, que provoca un aumento en la expresión de moléculas de adhesión sobre el endotelio, la contracción del músculo liso y una elevada permeabilidad vascular. C5 des-Arg (que carece de la arginina en C-terminal) es una anafilotoxina mucho menos potente. Tanto C5a como C5a des-Arg pueden desencadenar la desgranulación de mastocitos, liberando las moléculas proinflamatorias histamina y TNF- α . C5a también es un quimioatrayente eficaz, que inicia la acumulación de células del complemento y fagocitos a sitios de infección o el reclutamiento de células presentadoras de antígeno en nódulos linfoides. C5a desempeña un papel importante en el aumento de la migración y adherencia de neutrófilos y monocitos a las paredes de los vasos. Los glóbulos blancos se activan mediante regulación positiva de la afección de la integrina, la ruta de la lipoxigenasa y el metabolismo del ácido araquidónico. C5a también modula el equilibrio entre la activación frente a los inhibidores de los receptores de Fc de IgG en los leucocitos, potenciando de este modo la respuesta autoinmunitaria.

Un vector de VAA descrito en el presente documento puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo anti-C5.

El anticuerpo anti-C5 se puede unir a C5 y evitar la escisión de C5 en C5a y C5b.

Los anticuerpos anti-C5 adecuados son conocidos en la materia. Tales anticuerpos incluyen, aunque sin limitación, eculizumab.

Anticuerpo

Un anticuerpo, se refiere a cualquier porción de un anticuerpo o un fragmento del mismo que conserva la capacidad para unirse al mismo antígeno diana que el anticuerpo original.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico. Los anticuerpos quiméricos se pueden producir mediante el trasplante de dominios variables de anticuerpos desde una especie (por ejemplo, un ratón) a dominios constantes de anticuerpos de otra especie (por ejemplo, un ser humano).

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

10 El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo funcional. Los fragmentos de anticuerpos específicos incluyen, aunque sin limitación, (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 único anticuerpo, (iv) el fragmento dAb, que consiste en un único dominio variable, (v) las regiones CDR aisladas, (vi) los fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en los que un dominio VP y un dominio VL están unidos por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno, (viii) los dímeros Fv monocatenarios biespecíficos y (ix) "diacuerpos" o "triacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos contruidos mediante fusión génica. Los fragmentos de anticuerpos pueden estar modificados. Por ejemplo, se pueden estabilizar las moléculas mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL.

20 El anticuerpo descrito en el presente documento puede ser un anticuerpo multispecífico, y notablemente un anticuerpo biespecífico, también a veces denominado "diacuerpos". Estos son anticuerpos que se unen a dos (o más) antígenos diferentes. El anticuerpo puede ser un minicuerpo. Los minicuerpos son proteínas de tipo anticuerpo 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 algunas o todas las regiones bisagra.

25 El anticuerpo puede ser un anticuerpo de dominio (también denominado anticuerpo de dominio único o nanocuerpo). Esto es un fragmento de anticuerpo que contiene un único dominio variable de anticuerpo monomérico. Los ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen, aunque sin limitación, fragmentos de VHH hallados originariamente en camélidos y fragmentos de VNAR hallados originariamente en peces cartilaginosos. Los anticuerpos de dominio único también se pueden generar dividiendo los dominios variables diméricos de las moléculas comunes de IgG en monómeros.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo sintético (también denominado mimético de anticuerpo). Los miméticos de anticuerpos incluyen, aunque sin limitación, afficuerpos, DARPin, anticalinas, avímeros, versacuerpos y duocalinas.

35 Degeneración macular asociada a la edad (DMAE)

La progresión clínica de la DMAE se caracteriza en etapas de acuerdo con los cambios en la mácula. El sello distintivo de la DMAE temprana son las drusas, que son acumulaciones de restos extracelulares por debajo de la retina y aparecen como manchas amarillas en la retina en exámenes clínicos y en retinografías. Las drusas se clasifican por tamaño como pequeñas (<63 µm), medias (63-124 µm) y grandes (>124 µm). También se consideran como duras o blandas dependiendo de la apariencia de sus márgenes en el examen oftalmológico. Mientras que las drusas duras tienen márgenes claramente definidos, las blandas tienen márgenes menos definidos y fluidos. La escala de gravedad de las retinografías de estudios de oftalmopatías asociadas a la edad (AREDS, del inglés *Age-related Eye Disease Study*) es uno de los principales sistemas de clasificación usados para esta afección.

45 La DMAE se clasifica como formas "secas" y "húmedas" (exudativa o neovascular). La DMAE seca es más común que la DMAE húmeda, pero la forma seca puede progresar a la forma húmeda, y las dos tienen lugar de manera simultánea en un número significativo de casos. La DMAE seca se caracteriza típicamente mediante la apoptosis progresiva de las células en la capa del EPR, que se superpone a las células fotorreceptoras y, con frecuencia, también a las células subyacentes en la capa capilar corioidea. Las áreas confluentes de la muerte celular del EPR acompañada por la atrofia de fotorreceptores suprayacentes se denominan atrofia geográfica (AG). Los pacientes con esta forma de DMAE experimentan un deterioro lento y progresivo de la visión central.

55 La DMAE húmeda se caracteriza por el sangrado y/o la filtración de líquido de vasos anómalos que han crecido desde los vasos corioideos (coriocapilares) por debajo del EPR y la mácula, que puede ser responsable de la pérdida de visión repentina e incapacitante. Se ha estimado que gran parte de la pérdida de visión que experimentan los pacientes se debe a tal neovascularización corioidea (NVC) y a sus complicaciones secundarias.

60 El tratamiento o la prevención de DMAE descrito en el presente documento puede reducir o evitar la apariencia de un fenotipo de DMAE descrito anteriormente. Preferentemente, el tratamiento de DMAE permite el mantenimiento o la mejora en la función visual.

65 En una realización, el tratamiento o la prevención de DMAE da como resultado una prevención de o la reducción en la formación de atrofia geográfica. En otra realización, el tratamiento o la prevención de DMAE da como resultado una ralentización de la progresión de atrofia geográfica. Por ejemplo, da como resultado al menos un 10 %, un 20 %, un 30%, un 40%, un 50%, un 60%, un 70%, un 80 % o un 90 % de reducción en el aumento en el área de AG

durante los 12 meses tras la administración a un ojo tratado de un sujeto, en relación con un ojo sin tratar durante el mismo período. En otra realización, el tratamiento o la prevención de DMAE da como resultado el tratamiento de atrofia geográfica, por ejemplo, una reducción en la cantidad de atrofia geográfica.

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

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

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

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

En una realización, el tratamiento o la prevención de DMAE da como resultado una reducción o la prevención de pérdida de fotorreceptores y/o del epitelio pigmentario retinal (EPR).

25 Retinopatía diabética

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

30 Aunque los sujetos con retinopatía diabética leve pueden tener buena visión, dos tipos de retinopatía diabética, llamados edema macular diabético (EMD) y retinopatía diabética proliferativa (RDP) pueden poner en riesgo la visión del sujeto.

35 El edema macular diabético se caracteriza por la filtración de líquido de los vasos sanguíneos dañados en la parte posterior del ojo. El líquido filtrado se acumula en la mácula, lo que lleva a inflamación y a visión borrosa. Esto puede ocasionalmente dar lugar a una mala visión y a una incapacidad para leer o conducir. La visión lateral normalmente permanece normal.

40 La retinopatía diabética proliferativa se caracteriza por el cierre de los vasos sanguíneos retinianos, lo que lleva al crecimiento de vasos sanguíneos frágiles y anómalos sobre la superficie de la retina. Esto puede dar como resultado una pérdida de visión permanente debido a la hemorragia en el ojo, esclerosis retiniana y desprendimiento de retina.

Estructura del ojo

45 Los medicamentos desvelados en el presente documento se pueden administrar a un ojo de mamífero, preferentemente de ser humano en relación al tratamiento o la prevención de degeneración macular asociada a la edad (DMAE).

50 El experto en el tratamiento de oftalmopatías tendrá un entendimiento detallado y completo de la estructura del ojo. Sin embargo, se describen las siguientes estructuras de particular relevancia para la invención.

Retina

55 La retina es la membrana multilaminar, 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 hasta el exterior del ojo, la retina comprende las capas de retina neurosensorial y epitelio pigmentario retinal, con la coroides que yace fuera del epitelio pigmentario retinal.

Retina neurosensorial y células fotorreceptoras

60 La retina neurosensorial alberga las células fotorreceptoras que detectan directamente la luz. Comprende las siguientes capas: membrana limitante interna (MLI); capa de fibra nerviosa; capa de células ganglionares; capa plexiforme interna; capa nuclear interna; capa plexiforme externa; capa nuclear externa (núcleos de los fotorreceptores); membrana limitante externa (MLE); y fotorreceptores (segmentos internos y externos de los bastones y conos).

El experto en la materia tendrá un entendimiento detallado de las células fotorreceptoras. Brevemente, las células fotorreceptoras son neuronas especializadas localizadas en la retina que convierten la luz en señales biológicas. Las células fotorreceptoras comprenden bastones y conos, que se distribuyen de manera diferente a través de la retina.

5 Los bastones se distribuyen principalmente a través de las partes externas de la retina. Son altamente sensibles y proporcionan la visión a bajos niveles de luz. En promedio, hay aproximadamente 125 millones de bastones en una retina humana normal.

10 Los conos se encuentran a través de la retina, pero, en particular, están altamente concentrados en la fovea, una depresión en la retina neurosensorial que es responsable de la visión central de alta resolución. Los conos son menos sensibles que los bastones. En promedio, hay aproximadamente 6-7 millones de conos en una retina humana normal.

Epitelio pigmentario retinal

15 El epitelio pigmentario retinal (EPR) es una capa pigmentada de células localizada inmediatamente hacia el exterior de la retina neurosensorial. El EPR realiza una serie de funciones, incluyendo el transporte de nutrientes y de otras sustancias a las células fotorreceptoras y la absorción de luz dispersa para mejorar la visión.

Coroides

20 La coroides es la capa vascular situada entre el EPR y la esclerótica externa del ojo. La vasculatura de la coroides permite el aprovisionamiento de oxígeno y nutrientes a la retina.

Vectores de virus adenoasociados (VAA)

25 En un aspecto, la invención proporciona un vector de VAA que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o un fragmento del mismo, en donde el fragmento es capaz de escindir C3b en iC3b.

30 Preferentemente, el vector de VAA está en la forma de una partícula de VAA.

Los métodos para preparar y modificar vectores víricos y partículas de vectores víricos, tales como las derivadas de VAA, son bien conocidos en la materia.

35 El vector de VAA puede comprender un genoma de VAA o un fragmento o derivado del mismo.

40 Un genoma de VAA es una secuencia de polinucleótidos, que codifica funciones necesarias para la producción de una partícula de VAA. Estas funciones incluyen aquellas que funcionan en el ciclo de replicación y empaquetamiento de VAA en una célula hospedadora, incluyendo la encapsidación del genoma de VAA en una partícula de VAA. Los VAA de origen natural son deficientes en la replicación y dependen del aprovisionamiento de funciones auxiliares en trans para completar un ciclo de replicación y empaquetamiento. Por consiguiente, el genoma de VAA del vector de VAA de la invención es típicamente deficiente en replicación.

45 El genoma de VAA puede estar en forma de cadena simple, bien de sentido positivo o de sentido negativo o, como alternativa en forma de doble cadena. El uso de una forma de doble cadena permite la desviación de la etapa de replicación de ADN en la célula diana y, de este modo, acelerar la expresión transgénica.

50 El genoma de VAA puede ser de cualquier serotipo aislado o clado de VAA de origen natural. De este modo, el genoma de VAA puede ser el genoma completo de un VAA de origen natural. Como es sabido por el experto en la materia, los VAA que se dan en la naturaleza se pueden clasificar de acuerdo con diversos sistemas biológicos.

55 Habitualmente, se citan los VAA en función de su serotipo. Un serotipo se corresponde con una subespecie de variante de VAA que, debido a su perfil de expresión de antígenos de superficie de la cápside, tiene una reactividad distintiva que se puede usar para distinguirlo de otras subespecies de variantes. Típicamente, un virus que tiene un serotipo particular de VAA no reacciona de forma cruzada con anticuerpos neutralizantes específicos para cualquier otro serotipo de VAA.

60 Los serotipos de VAA incluyen VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10 y VAA11 y también serotipos recombinantes, tales como Rec2 y Rec3, identificados recientemente a partir del cerebro de primates. Cualquiera de estos serotipos de VAA se puede usar en la invención. De este modo, en una realización de la invención, la partícula del vector de VAA es una partícula del vector de VAA VAA1, VAA2, VAA3, VAA4, VAA5, VAA6, VAA7, VAA8, VAA9, VAA10, VAA11, Rec2 o Rec3.

65 En una realización, el VAA puede ser un serotipo VAA1, VAA2, VAA5, VAA7, VAA8 o VAA8.

En una realización, el VAA puede ser un serotipo VAA2 o VAA8.

La proteína de la cápside puede ser una proteína de la cápside mutante tal como la desvelada en el documento WO 2008/124724.

En una realización, el vector de VAA comprende una cápside de VAA8 con una mutación Y733F.

Las revisiones de los serotipos de VAA se pueden encontrar en Choi et al. (2005) Curr. Gene Ther. 5: 299-310 y Wu et al. (2006) Molecular Therapy 14: 316-27. Las secuencias de los genomas de VAA o de elementos de genomas de VAA que incluyen las secuencias de RTI, los genes rep o cap para su uso en la invención pueden provenir de los siguientes números de registro para las secuencias de genoma completo de VAA: Virus adenoasociado 1 NC_002077, AF063497; Virus adenoasociado 2 NC_001401; Virus adenoasociado 3 NC_001729; Virus adenoasociado 3B NC_001863; Virus adenoasociado 4 NC_001829; Virus adenoasociado 5 Y18065, AF085716; Virus adenoasociado 6 NC_001862; VAA aviar ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC_004828; Cepa DA-1 del VAA aviar NC_006263, AY629583; VAA bovino NC_005889, AY388617.

Los VAA también se pueden citar en función de clados o clones. Esto se refiere a las relaciones filogenéticas de los VAA de origen natural, y típicamente a un grupo filogenético de VAA que se puede remontar a un ancestro común, e incluye todos los descendientes del mismo. Además, los VAA se pueden citar en función de un aislado específico, es decir, un aislado genético de un VAA específico hallado en la naturaleza. El término aislado genético describe una población de VAA que se ha sometido a una mezcla genética limitada con otros VAA de origen natural, definiendo de este modo una población distinta reconocible a nivel genético.

El experto en la materia puede seleccionar un serotipo, clado, clon o aislado de VAA adecuado para su uso en la invención basándose en sus conocimientos generales comunes. Por ejemplo, se ha demostrado que la cápside de VAA5 transduce eficazmente fotorreceptores de conos tal como se evidenció mediante la corrección exitosa de un defecto de visión de color heredado (Mancuso et al. (2009) Nature 461: 784-7).

El serotipo de VAA determina la especificidad de tejidos de infección (o tropismo) de un VAA. Por consiguiente, los serotipos de VAA para su uso en VAA administrados a pacientes de acuerdo con la invención son aquellos que tienen tropismo natural para una alta eficiencia de inyección de células diana en el ojo. En una realización, los serotipos de VAA para su uso en la invención son aquellos que transducen células de la retina neurosensorial, del epitelio pigmentario retinal y/o de la coroides.

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

Un promotor estará unido de manera operativa 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. EEUU 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.

Tal como se ha tratado anteriormente, el genoma de VAA usado en el vector de VAA de la invención puede, por lo tanto, ser el genoma completo de un VAA de origen natural. Por ejemplo, un vector que comprende un genoma completo de VAA se puede usar para preparar un vector de VAA o una partícula de vector *in vitro*. Sin embargo, aunque tal vector en principio se puede administrar a los pacientes, esto rara vez se hará en la práctica. Preferentemente, el genoma de VAA se convertirá en derivados para el fin de administración a pacientes. Tal conversión en derivados es estándar en la materia y la invención abarca el uso de cualquier derivado conocido de un genoma de VAA y derivados que se podrían generar mediante la aplicación de técnicas conocidas en la materia. La conversión del genoma de VAA y de la cápside de VAA en derivados se revisa en Coura y Nardi (2007) Virology Journal 4: 99, y en Choi et al. y Wu et al., citados anteriormente.

Los derivados de un genoma de VAA incluyen cualquier forma truncada o derivada de un genoma de VAA que permita la expresión *in vivo* de un transgén desde un vector de VAA de la invención. Típicamente, es posible truncar el genoma de VAA de manera significativa para incluir secuencias víricas mínimas que aún conservan 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 que se desencadene una respuesta inmunológica celular mediante la presencia de proteínas de genes víricos en la célula diana.

Típicamente, un derivado incluirá al menos una secuencia de repetición terminal invertida (RTI), preferentemente, más de una RTI, tal como dos o más RTI. Una o más RTI pueden provenir de genomas de VAA que tienen

diferentes serotipos, o puede ser una RTI quimérica o mutante. Una RTI mutante preferida es una que tiene una delección de un trs (del inglés *terminal resolution site*, sitio de resolución terminal). Esta delección permite la replicación continua del genoma para generar un genoma de cadena simple que contiene tanto secuencias codificantes como complementarias, es decir, un genoma de VAA autocomplementario. Esto permite la desviación de la replicación de ADN en la célula diana y, por lo tanto, permite la expresión transgénica acelerada.

Una o más secuencias de RTI preferentemente flanquearán a la secuencia de nucleótidos que codifican al Factor I (o al fragmento del mismo) en cualquier extremo. La inclusión de una o más RTI se prefiere para ayudar a la formación de concatémeros del vector de la invención en el núcleo de una célula hospedadora, por ejemplo, tras la conversión de ADN de cadena simple del vector en ADN de cadena doble mediante la acción de ADN polimerasas de la célula hospedadora. La formación de tales concatémeros episomales protege la construcción del vector durante la vida de la célula hospedadora, permitiendo de este modo la expresión prolongada del transgén *in vivo*.

En realizaciones preferidas, los elementos de RTI serán las únicas secuencias conservadas del genoma de VAA natural en el derivado. De este modo, un derivado preferentemente no incluirá los genes rep y/o cap del genoma natural ni cualquier otra secuencia del genoma natural. Esto se prefiere por las razones descritas anteriormente, y también para reducir la posibilidad de integración del vector en el genoma de la célula hospedadora. Además, la reducción del tamaño del genoma de VAA permite una elevada flexibilidad en la incorporación de otros elementos de secuencia (tales como los elementos reguladores) en el vector además del transgén.

Las siguientes partes, por lo tanto, se podrían eliminar en un derivado de la invención: una secuencia de repetición terminal invertida (RTI), los genes de replicación (rep) y de la cápside (cap). Sin embargo, en algunas realizaciones, los derivados pueden incluir adicionalmente uno o más genes rep y/o cap u otras secuencias víricas de un genoma de VAA. El VAA de origen natural se integra con una elevada frecuencia en un sitio específico del cromosoma 19 humano, y presenta una frecuencia insignificante de integración aleatoria, de manera que la retención de una capacidad integradora en el vector se puede tolerar en un entorno terapéutico.

Cuando un derivado comprende proteínas de la cápside, es decir, VP1, VP2 y/o VP3, el derivado puede ser un derivado quimérico modificado aleatoriamente o modificado por la cápside de uno o mas VAA de origen natural. En particular, la invención abarca el aprovisionamiento de secuencias de proteína de la cápside de diferentes serotipos, clados, clones o aislados de VAA en el mismo vector (es decir, un vector pseudotipado).

Los derivados quiméricos, modificados aleatoriamente o modificados por la cápside típicamente se seleccionarán para proporcionar una o más funcionalidades deseadas para el vector de VAA. De este modo, estos derivados pueden presentar una elevada eficacia de administración génica, una baja inmunogenicidad (humoral o celular), un intervalo de tropismo alterado y/o un direccionamiento mejorado de un tipo celular particular en comparación con un vector de VAA que comprende un genoma de VAA de origen natural, tal como el de VAA2. La elevada eficacia de administración génica puede estar afectada por un receptor o correceptor mejorado que se une a la superficie celular, una internalización mejorada, un tráfico mejorado en la célula y en el núcleo, una rotura de la partícula vírica mejorada y una conversión mejorada de un genoma de cadena simple a forma de cadena doble. La elevada eficacia también se puede relacionar con un intervalo de tropismo alterado o el direccionamiento de una población celular específica, de manera que la dosis del vector no se diluye mediante la administración a tejidos cuando no es necesario.

Las proteínas quiméricas de la cápside incluyen las generadas mediante recombinación entre dos o más secuencias codificantes de la cápside de serotipos de VAA de origen natural. Esto se puede realizar, por ejemplo, mediante una estrategia de rescate de marcador en la que las secuencias de la cápside no infecciosa de un serotipo se contranfectan con las secuencias de la cápside de un serotipo diferente, y se usa la selección dirigida para seleccionar las secuencias de la cápside que tienen propiedades deseadas. Las secuencias de la cápside de los diferentes serotipos se pueden alterar mediante recombinación homóloga en la célula para producir nuevas proteínas quiméricas de la cápside.

Las proteínas quiméricas de la cápside también incluyen las generadas mediante ingeniería genética de las secuencias de la proteína de la cápside para transferir dominios específicos de las proteínas de la cápside, bucles de superficie o restos específicos de aminoácidos entre dos o más proteínas de la cápside, por ejemplo, entre dos o más proteínas de la cápside de diferentes serotipos.

Las proteínas de la cápside quiméricas o modificadas aleatoriamente también se pueden generar mediante aleatorización de ADN o mediante EP-PCR. Los genes de la cápside híbrida de VAA se pueden crear mediante fragmentación aleatorizada de las secuencias de los genes relacionados, por ejemplo, los que codifican proteínas de la cápside de múltiples serotipos diferentes y después reensamblando posteriormente los fragmentos en una reacción de la polimerasa autocebante, que también puede provocar sobrecruzamientos en regiones de homología de secuencia. Se puede examinar una biblioteca de genes de VAA híbridos creados de este modo mediante aleatorización de los genes de la cápside de varios serotipos para identificar los clones víricos que tienen una funcionalidad deseada. De forma similar, se puede usar la EP-PCR para mutar aleatoriamente los genes de la

cápside del VAA para crear una biblioteca diversa de variantes que se pueda seleccionar después para una propiedad deseada.

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

La proteína o el péptido no relacionado puede ser ventajosamente uno que actúa como un ligando para un tipo celular particular, que confiere de este modo una unión mejorada a una célula diana o mejora la especificidad del direccionamiento del vector hacia una población celular particular. Un ejemplo puede incluir el uso del péptido RGD para bloquear la absorción en el epitelio pigmentario retinal y mejorar de este modo la transducción de los tejidos retinianos adyacentes (Cronin et al. (2008) ARVO Resumen: D1048). La proteína no relacionada también puede ser una que ayuda a la purificación de la partícula vírica como parte del proceso de producción, es decir, un epítipo o un marcador de afinidad. El sitio de inserción se seleccionará típicamente para que no interfiera con otras funciones de la partícula vírica, por ejemplo, internalización, tráfico de la partícula vírica. El experto en la materia puede identificar sitios adecuados para la inserción basándose en su conocimiento general común. Los sitios particulares se desvelan en Cho et al., citado anteriormente.

La invención abarca adicionalmente el aprovisionamiento de secuencias de un genoma de VAA en un orden y configuración diferente a la del genoma de VAA nativo. La invención también abarca la sustitución de una o más secuencias o genes de VAA de otro virus o con genes quiméricos compuestos de secuencias de más de un virus. Tales genes quiméricos pueden estar compuestos de secuencias de dos o más proteínas víricas relacionadas de diferentes especies víricas.

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

Las partículas de VAA de la invención incluyen formas transcapsidadas en donde un genoma de VAA o derivado que tiene una RTI de un serotipo se empaqueta en la cápside de un serotipo diferente. Las partículas de VAA de la invención también incluyen formas en mosaico donde una mezcla de proteínas de la cápside no modificadas de dos o más serotipos diferentes constituyen la cápside vírica. La partícula de VAA también incluye formas químicamente modificadas que llevan ligandos adsorbidos a la superficie de la cápside. Por ejemplo, tales ligandos pueden incluir anticuerpos dirigidos al receptor de superficie celular particular.

De este modo, por ejemplo, las partículas de VAA de la invención incluyen aquellas con un genoma de VAA2 y proteínas de la cápside de VAA2 (VAA2/2), aquellas con un genoma de VAA2 y proteínas de la cápside de VAA5 (VAA2/5) y aquellas con un genoma de VAA2 y proteínas de la cápside de VAA8 (VAA2/8) así como aquellas con un genoma de VAA2 y proteínas de la cápside de más de un serotipo.

El vector de VAA puede comprender múltiples copias (por ejemplo, 2, 3, etc.) de la secuencia de nucleótidos citada para el presente documento.

Promotores y secuencias reguladoras

El vector de VAA de la invención también puede incluir elementos que permiten la expresión del transgén del Factor I (o el fragmento del mismo) in vitro o in vivo. Estos se pueden denominar secuencias de control de la expresión. De este modo, el vector de VAA típicamente comprende secuencias de control de la expresión (por ejemplo, que comprenden una secuencia del promotor) unidos de manera operativa a la secuencia de nucleótidos que codifica el transgén.

Se puede usar cualquier promotor adecuado, cuya selección se puede hacer fácilmente por el experto. La secuencia del promotor puede estar constitutivamente activa (es decir, operacional en cualquier fondo de célula hospedadora) o como alternativa puede ser activa solo en un ambiente de célula hospedadora específico, permitiendo de este modo la expresión dirigida del transgén en un tipo celular particular (por ejemplo, un promotor específico de tejido). El promotor puede presentar una expresión inducible en respuesta a la presencia de otro factor, por ejemplo, un factor presente en una célula hospedadora. En cualquier caso, cuando el vector se administra para terapia, se prefiere que el promotor estuviese funcional en el fondo de la célula diana.

En algunas realizaciones, se prefiere que el promotor presente la expresión específica de células retinianas para permitir que solo se exprese el transgén en las poblaciones de células retinianas. De este modo, la expresión del promotor puede ser específica de células retinianas, por ejemplo, confinada solo a células de la retina neurosensorial y del epitelio pigmentario retinal.

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

5
 ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTG
 GAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG
 ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTG
 GCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTC
 CCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCGATGG
 GGGCGGGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGAGGCG
 GAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGCGCGG
 CGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCC
 GCTCCGCCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCG
 GGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTG
 CGTGAAGCCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGCTGTCCGCGGGGG
 GACGGCTGCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAG
 CCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCT
 GTCTCATCATTTTGGCAAAGAATT

(SEQ ID NO: 5)

- En una realización, el vector de VAA comprende un promotor con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.
- 10 En otra realización, el vector de VAA comprende un promotor con una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 5, en donde la secuencia de nucleótidos mantiene sustancialmente la actividad funcional del promotor representado por la SEQ ID NO: 5.
- 15 Los ejemplos de promotores basados en las secuencias humanas que inducirían la expresión génica específica de la retina incluyen rodopsina cinasa para bastones y conos (Alloca 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 retinal.
- 20 El vector de VAA de la invención también puede comprender uno o más secuencias reguladoras adicionales que puedan actuar antes o después de la transcripción. La secuencia reguladora puede ser parte del locus natural del transgén o puede ser una secuencia reguladora heteróloga. El vector de VAA de la invención puede comprender partes de la 5'-UTR o de la 3'-UTR del transcrito natural del transgén.
- 25 Las secuencias reguladoras son cualquier secuencia que facilite la expresión del transgén, es decir, que actúa para aumentar la expresión de un transcrito, mejora la exportación nuclear de ARNm o mejora su estabilidad. Tales 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 hormona de crecimiento bovino que puede ser como se muestra a continuación:

30
 TCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCTTCC
 TTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCTTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGA
 GTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAG
 CAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGG

(SEQ ID NO: 6)

- En una realización, el vector de VAA comprende un sitio de poliadenilación con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 6. En otra realización, el vector de VAA comprende un sitio de poliadenilación con una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 6, en donde la secuencia de nucleótidos mantiene sustancialmente la actividad funcional del sitio de poliadenilación representado por la SEQ ID NO: 6.
- 35
- En el contexto del vector de VAA de la invención, tales secuencias reguladoras estarán actuando en cis. Sin embargo, la invención también abarca el uso de secuencias reguladoras que actúan en trans localizadas sobre construcciones genéticas adicionales.
- 40
- Un elemento regulador postranscripcional preferido para su uso en un vector de VAA de la invención es el elemento regulador postranscripcional de hepatitis de marmota (WPPE) o una variante del mismo. A continuación, se muestra una secuencia de ejemplo del WPPE:
- 45

ATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCCTTTTACGCT
 ATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCATTTTCTCCTCC
 TTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGT
 GCACTGTGTTTGGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGAC
 TTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCTGCTTGGCCGCTGCTGGACAGGG
 GCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTGCGGGGAAATCATCGTCCTTTTCTTGGCTGCTCG
 CCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCTTCCGGCCCTCAATCCAGCGGA
 CCTTCCTTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGT
 CGGATCTCCCTTTGGGCGGCTCCCCGC

(SEQ ID NO: 7)

- 5 En una realización, el vector de VAA comprende un elemento regulador postranscripcional con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 7. En otra realización, el vector de VAA comprende un elemento regulador postranscripcional con una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70 %, un 80 %, un 90 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 %, un 99 % o un 100 % de identidad con la SEQ ID NO: 7, en donde la secuencia de nucleótidos mantiene 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 de VAA sin un WPRE. Preferentemente, las variantes de secuencias presentan al menos el 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 7 a lo largo de su secuencia completa, más preferentemente un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 % y más preferentemente al menos un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 7 a lo largo de su secuencia completa.
- 15 Otra secuencia reguladora que se puede usar en un vector de VAA de la invención es una región de unión a andamiaje (SAR, del inglés *scaffold-attachment region*). Las secuencias reguladoras adicionales se pueden seleccionar fácilmente por el experto.
- 20 **Método de administración**
- Un vector de VAA de la invención se puede administrar preferentemente por vía intraocular.
- 25 El término "intraocular" se refiere al interior del ojo, por lo tanto, la administración intraocular se refiere a la administración al interior del ojo de un sujeto.
- En una realización descrita en el presente documento, el vector de VAA administrado al ojo de un sujeto mediante inyección subretiniana, retiniana directa, supracoroidea o intravítrea. En una realización descrita en el presente documento, dicha administración se realiza mediante un robot.
- 30 El volumen de la composición del medicamento inyectada puede, por ejemplo, ser de aproximadamente 10-500 µl, por ejemplo de aproximadamente 50-500, 100-500, 200-500, 300-500, 400-500, 50-250, 100-250, 200-250 o 50-150 µl. El volumen puede, por ejemplo, ser de aproximadamente 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 µl. Preferentemente, el volumen de la composición del medicamento inyectado es 100 µl.
- 35 El experto en la materia estará familiarizado con y será capaz de llevar a cabo inyecciones individuales subretinianas, retinianas directas, supracoroideas o intravítreas.
- 40 Preferentemente, el vector de VAA se administra mediante inyección subretiniana.
- En una realización descrita en el presente documento, el vector de VAA o la composición farmacéutica que comprende la misma se administra no más de una vez o no más de dos veces, durante la vida de un sujeto.
- 45 *Inyección subretiniana*
- Las inyecciones subretinianas son inyecciones en el espacio subretiniano, es decir, por debajo de la retina neurosensorial. Durante una inyección subretiniana, el material inyectado se dirige a, y crea un espacio entre, la capa de células fotorreceptoras y la de epitelio pigmentario retinal (EPR).
- 50 Cuando la inyección se lleva a cabo mediante una pequeña retinotomía, se puede crear desprendimiento de retina. La capa desprendida y levantada de la retina que se genera por el material inyectado se denomina "vesícula".
- 55 El orificio creado por la inyección subretiniana debe ser lo suficientemente pequeño como para que la solución inyectada no tenga un reflujo significativo de vuelta a la cavidad vítreas tras la administración. Tal reflujo sería particularmente problemático cuando se inyecta un medicamento, porque los efectos del medicamento se dirigirían

fuera de la zona diana. Preferentemente, la inyección crea un punto de entrada de autosellado en la retina neurosensorial, es decir, una vez que se ha retirado la aguja, el orificio creado por la aguja se vuelve a sellar, de manera que se libera muy poco material o nada a través del orificio.

- 5 Para facilitar este proceso, están comercialmente disponibles las agujas especiales para inyección subretiniana (por ejemplo, la aguja de inyección subretiniana DORC 41G Teflon, Dutch Ophthalmic Research Center International BV, Zuidland, Países Bajos). Éstas son agujas diseñadas para llevar a cabo inyecciones subretinianas.

10 Salvo que el daño a la retina tenga lugar durante la inyección, y siempre que se use una aguja lo suficientemente pequeña, sustancialmente todos los materiales inyectados permanecen localizados entre la retina neurosensorial desprendida y el EPR en el lugar del desprendimiento retiniano localizado (es decir, no hay reflujo hacia la cavidad vítrea). De hecho, la persistencia típica de la vesícula durante un marco temporal corto indica que hay normalmente un pequeño escape del material inyectado hacia el vítreo. La vesícula se puede disipar durante un marco temporal más largo a medida que se absorbe el material inyectado.

15 Las visualizaciones del ojo, en particular, de la retina, por ejemplo, usando tomografía de coherencia óptica, se pueden hacer de manera preoperativa.

20 El volumen de la composición del medicamento inyectada puede, por ejemplo, ser de aproximadamente 10-500 µl, por ejemplo de aproximadamente 50-500, 100-500, 200-500, 300-500, 400-500, 50-250, 100-250, 200-250 o 50-150 µl. El volumen puede, por ejemplo, ser de aproximadamente 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 µl. Preferentemente, el volumen de la composición del medicamento inyectado es 100 µl. Volúmenes mayores pueden aumentar el riesgo de estiramiento de retina, mientras que volúmenes menores puede ser difíciles de ver.

25 *Inyección subretiniana de dos etapas*

El vector de la invención se puede administrar con una mayor precisión y seguridad usando un método de dos etapas en el que se crea un desprendimiento retiniano localizado mediante la inyección subretiniana de una primera solución. La primera solución no comprende el vector. Después se usa una segunda inyección subretiniana para administrar el medicamento que comprende el vector en el fluido subretiniano de la vesícula creada mediante la primera inyección subretiniana. Dado que la inyección que administra el medicamento no se usa para desprender la retina, se puede inyectar un volumen específico de solución en esta segunda etapa.

35 En una realización descrita en el presente documento, la inyección subretiniana del vector comprende las etapas:

- (a) administrar una solución al sujeto mediante inyección subretiniana en una cantidad eficaz para desprender al menos en parte la retina para formar una vesícula subretiniana, en donde la solución no comprende el vector; y
- (b) administrar una composición de medicamento mediante inyección subretiniana en la vesícula formada por la etapa (a), en donde el medicamento comprende el vector.

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

50 El volumen de la composición del medicamento inyectada en la etapa (b) puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 10-500 µl, por ejemplo de 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, de aproximadamente 10, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 µl. Preferentemente, el volumen de la composición del medicamento inyectado en la etapa (b) es 100 µl. Volúmenes mayores pueden aumentar el riesgo de estiramiento de retina, mientras que volúmenes menores puede ser difíciles de ver.

55 La solución que no comprende el medicamento (es decir, la "solución" de la etapa (a)) puede estar formulada de manera similar a la solución que comprende el medicamento, como se describe más adelante. Una solución preferida que no comprende el medicamento es solución salina equilibrada (BBS, del inglés *balanced saline solution*) o un tampón similar que coincida con el pH y la osmolalidad del espacio subretiniano.

60 *Visualización de la retina durante la cirugía*

En determinadas circunstancias, por ejemplo, durante las degeneraciones de retina de la última etapa, la identificación de la retina es difícil debido a que es delgada, transparente y difícil de ver frente al epitelio alterado y fuertemente pigmentado sobre el que se asienta. El uso de un colorante azul vital (por ejemplo, Brilliant Peel®, Geuder; MembraneBlue-Dual®, Dorc) puede facilitar la identificación del orificio retiniano hecho para el procedimiento de desprendimiento retiniano (es decir, etapa (a) en el método de inyección subretiniana de dos etapas descrito en el

presente documento) de manera que el medicamento se pueda administrar a través del mismo orificio sin el riesgo de reflujo de vuelta hacia la cavidad vítrea.

El uso del colorante azul vital también identifica cualquiera de las regiones de la retina en donde haya una membrana limitante interna engrosada o una membrana epirretiniana, dado 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 inmediatamente postoperatorio podría llevar al estiramiento del orificio retiniano de entrada, lo que podría llevar al reflujo del medicamento en la cavidad vítrea.

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 realizada para exponer la esclerótica basal, seguida por una esclerotomía para exponer la coroides desnuda. Un microcatéter (tal como el iTrack 250A de iScience Interventional, conectado de manera opcional a un sistema de iluminación tal como el sistema de microiluminación basado en diodo láser iLumin (iScience Interventional)) se introduce en el espacio supracoroideo y avanza posteriormente hacia el disco óptico. Tras la manipulación de la punta del catéter en la posición deseada, la inyección del vector forma una vesícula en la retina y la coroides.

De este modo, 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) avanzar el microcatéter en dicho espacio hasta que la punta esté en la proximidad de la región afligida de la retina; y (iii) inyectar el vector desde la punta del microcatéter para crear una vesícula.

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

Composiciones farmacéuticas y soluciones inyectadas

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

La composición farmacéutica típicamente está en forma líquida. Las composiciones farmacéuticas líquidas incluyen, en general, un transportador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, cloruro de magnesio, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. En algunos casos se puede usar un tensioactivo tal como ácido plurónico (PF68) al 0,001 %.

Para la inyección en el sitio de aflicción, el principio activo puede estar en forma de una solución acuosa sin pirógeno y tiene un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. El experto en la materia es capaz de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer o inyección de Ringer lactato. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos según sea necesario.

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

Método de tratamiento

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

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

Variantes, derivados, análogos, homólogos y fragmentos

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

En el contexto de la divulgación, una variante de cualquier secuencia dada es una secuencia en la que la secuencia específica de restos (bien restos de aminoácidos o de ácidos nucleicos) se ha modificado de tal forma que el polipéptido o el polinucleótido en cuestión mantiene sustancialmente su función. Una variante de la secuencia se puede obtener mediante adición, delección, sustitución, modificación, reemplazamiento y/o variación de al menos un resto presente en la proteína de origen natural.

El término “derivado” tal como se usa en el presente documento, en relación con proteínas o polipéptidos descritos en el presente documento incluye cualquier sustitución de, variación de, modificación de, reemplazamiento de, delección de y/o adición de uno (o más) restos de aminoácidos de o para la secuencia asegurando que la proteína o el polipéptido resultante conserva sustancialmente al menos una de sus funciones endógenas.

El término “análogo” tal como se usa en el presente 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 a los que imita.

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

Las proteínas usadas en la invención también pueden tener delecciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una proteína funcionalmente equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos se pueden hacer basándose en la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, e hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos siempre que se conserve 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 sin carga que tienen valores de hidrofilia similares incluyen asparagina, glutamina, serina, treonina y tirosina.

Se pueden hacer sustituciones conservativas, por ejemplo, de acuerdo con la tabla a continuación. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna se pueden sustituir entre sí:

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

El término “homólogo” tal como se usa en el presente documento se refiere a una entidad que tiene una determinada homología con la secuencia de aminoácidos de tipo silvestre y la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre. El término “homología” se puede equiparar con “identidad”.

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

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

Preferentemente, la referencia a una secuencia que tiene un porcentaje de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO detalladas en el presente documento se refiere a una secuencia que tiene el porcentaje de identidad indicado a lo largo de la longitud completa de la SEQ ID NO a la que se refiere.

Las comparaciones de homología se pueden llevar a ojo o, más comúnmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos comercialmente disponibles pueden calcular el porcentaje de homología o identidad entre dos o más secuencias.

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 correspondiente aminoácido en la otra secuencia, un resto a la vez. Esto se llama alineación "desacoplada". Típicamente, tales alineaciones desacopladas se realizan solo sobre un número de restos relativamente corto.

Aunque este es un método muy simple y consistente, falla al considerar que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o delección en la secuencia de nucleótidos puede provocar que los siguientes codones estén fuera de la alineación, por lo tanto, dando posiblemente como resultado una gran reducción en el porcentaje de homología cuando se realiza una alineación global. Por consiguiente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineaciones óptimas que tengan en cuenta posibles inserciones y delecciones sin penalizar indebidamente la puntuación global de homología. Esto se logra insertando "huecos" en la alineación de secuencia para tratar de maximizar la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones por hueco" a cada hueco que se da en la alineación para que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencia con tan pocos huecos como sea posible, que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas, logre una mayor puntuación que una con muchos huecos. Normalmente se usan los "costes por hueco afin" que cobran un costo relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización menor por cada resto posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación por huecos comúnmente más usado. Las penalizaciones por hueco altas, por supuesto, producirán alineaciones optimizadas con menores huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere usar los valores por defecto cuando se usan tales programas informáticos para comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se usa el paquete GCG Wisconsin Bestfit, la penalización por hueco por defecto para secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

El cálculo de porcentaje de máxima homología requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, que tenga en consideración las penalizaciones por huecos. Un programa informático adecuado para llevar a cabo tal alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Universidad de Wisconsin, EEUU; Devereux et al. (1984) *Nucleic Acids Res.* 12: 387). Los ejemplos de otros programas informáticos que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, aunque sin limitación, el paquete BLAST (véase Ausubel et al. (1999) anteriormente citado - Cap. 18), FASTA (Atschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 403-410) y la GENWORKS adecuada de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para la búsqueda sin conexión o con conexión a internet (véase Ausubel et al. (1999) citado anteriormente, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere usar el programa GCG Bestfit. Otra herramienta, llamada BLAST 2 Sequences también está disponible para comparar proteínas y secuencias de nucleótidos (véase *FEMS Microbiol. Lett.* (1999) 174: 247-50; *FEMS Microbiol. Lett.* (1999) 177: 187-8).

Aunque el porcentaje final de homología se puede medir en términos de identidad, el proceso de alineación en sí no se basa típicamente en una comparación por pares de todo o nada. En su lugar, generalmente se usa una matriz de puntuación de similitud a escala que asigna puntuaciones a cada comparación por pares en función de la similitud química o de la distancia evolutiva. Un ejemplo de tal matriz comúnmente usada es la matriz BLOSUM62 - la matriz por defecto para el conjunto de programas BLAST. Los programas de GCG Wisconsin generalmente usan bien los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos a medida si se suministra (véase el manual del usuario para detalles adicionales). Para algunas aplicaciones, se prefiere usar los valores por defecto públicos para el paquete GCG, o en el caso de otros programas informáticos, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Una vez que el programa informático ha producido una alineación óptima, es posible calcular el porcentaje de homología, preferentemente el porcentaje de identidad de secuencia. El programa informático típicamente hace esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

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

Tales variantes se pueden preparar usando técnicas convencionales de ADN recombinante tales como mutagénesis de sitio dirigido. Cuando se van a hacer inserciones, se puede hacer ADN sintético que codifica la inserción junto con las regiones flanqueantes 5' y 3' que se corresponden con la secuencia de origen natural de cada lado del sitio de inserción. Las regiones flanqueantes contendrán los sitios de restricción apropiados que se corresponden con sitios en la secuencia de origen natural para que se pueda cortar la secuencia con la(s) enzima(s) apropiada(s) y se enlace el ADN sintético en el corte. El ADN se expresa después de acuerdo con la invención para crear la proteína codificada. Estos métodos son solo ilustrativos de las numerosas técnicas convencionales conocidas en la materia para la manipulación de secuencias de ADN y también se pueden usar otras técnicas conocidas.

Las diversas características y realizaciones preferidas de la presente invención se describirán a continuación a modo de ejemplos no limitantes.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, bioquímica, biología molecular, microbiología e inmunología, que están dentro de las capacidades de un experto en la materia. Dichas técnicas se explican por completo en las referencias. 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*, Cap. 9, 13 y 16, John Wiley y Sons; Roe, B., Crabtree, J. y Kahn, A. (1996) *DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques*, John Wiley y 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.

Ejemplos

Ejemplo 1

Clonación de ADNc humano de FCI y generación del casete de expresión ABP-FCI-WPRE, construcción de pVAA-ABP-FCI-WPRE-bGHpA y empaquetamiento del virus VAA-FCI.

El ADNc de la variante más común de secuencia de FCI humano se obtuvo de Genbank, número de registro NM_000204.4. El ADNc tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 2 y se pidió como fragmentos de genes de gBlocks® de Integrated DNA Technologies. También se pidió una segunda construcción de FCI en la que la secuencia de ADNc del gen FCI estaba optimizado por codón para la expresión en células humanas. La secuencia optimizada por codón ("FCloc") tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 8 y se pidió de GeneWiz (FCloc en el plásmido pUC57).

Estas secuencias de ADNc se insertaron en un plásmido cis pVAA, denominado pAM. pAM es un plásmido de elevado número de copias que proviene originariamente de pBR322, pero incluye repeticiones invertidas pero incluye repeticiones terminales de izquierda y derecha de VAA-2 estabilizadas que flanquean el casete de expresión de elección. Para el vector VAA-FCI y VAA-FCloc, se usó un promotor ABP/CAG modificado (actina beta de pollo con potenciador de CMV; denominado "ACP" en el presente documento) para dirigir la expresión de FCI y FCloc y una secuencia de WPRE modificada y un poliA de bGH se proporcionaron en 3' al ADNc. Los dos plásmidos se denominaron pVAA2.ABP-hFCI-WPRE-bGH, (pVAA-FCI) y pVAA2.ABP-hFCloc-WPRE-bGH, (pVAA-FCloc).

La Figura 2 muestra un gel de agarosa de digestos de restricción de FCI y FCloc. La banda de 1752 pb de FCI se excindió y se clonó en la estructura principal de pVAA-ABP-WPRE-bGHpA.

Comparación de los niveles de expresión de FCI de pVAA.FCI con pVAA.FCloc, la cotransfección de la línea celular ARPE-19 con pVAA-FCI o pVAA.FCloc y pCMV.GFP e inmunotransferencia de FCI.

ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™) es una línea celular de epitelio pigmentario retinal (EPR) que surge de manera espontánea en 1986 por Amy Aotaki-Keen a partir de los ojos normales de un hombre de 19 años de edad que murió de traumatismo encefálico en un accidente de vehículo motorizado. Estas células forman monocapas adherentes estables, que presentan una polarización morfológica cuando se colocan sobre filtros Transwell-COL recubiertos de laminina en medio con una baja concentración de suero. Se obtuvieron células ARPE-19 de la American Type Culture Collection (ATCC). Las células se cultivaron en DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific) complementado con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (Gibco), L-Glutamina 200 mM al 1 % (Sigma Aldrich) y Penicilina-Estreptomicina al 1 % (Sigma Aldrich, 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina/ml).

La cotransfección de ARPE-19 se realizó usando Lipofectamina LTX (Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se cotransfectaron 0,5 µg de pVAA-FCI o pVAA.FCloc con 0,5 µg de pCMV.GFP (Plasmid Factory). La cotransfección de un pVAA-ABP-WPRE-bGHpA (pVAA [sin casete de transgén]) sirvió como control negativo. A las 24 horas de la transfección, las células se lavaron con PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH a 7,2, Gibco™) y se cultivaron en medio de crecimiento sin suero durante 72 horas. Se tomó el sobrenadante, se aclaró mediante centrifugación y se almacenó a -80 °C. Las células ARPE-19 se desprendieron con TrypLE Express (Gibco) y se contaron para asegurar el mismo número de células por pocillo. El sedimento se congeló a -20 °C durante 30 minutos. Se añadió tampón de lisis 1xRIPA (Merck Millipore) complementado con mezcla de inhibidor de proteasa sin EDTA complete™ (Roche) al sedimento y las células se rompieron mediante ultrasonido. La proteína insoluble se centrifugó y el sobrenadante (= lisado) se almacenó a -80 °C.

Nombre/diana	Clase y hospedador	Proveedor	Dilución
Ox21/FCI humano	Monoclonal, ratón	Thermo Fisher Scientific	1:500-1000
Turbo-GFP	Policlonal, conejo	Thermo Fisher Scientific	1:5000
Anti-Factor I humano	Antisuero, cabra	Comptech	1:1000-5000
Anti-actina-β	Monoclonal, ratón	Abcam	1:20.000

Nombre/diana	Clase y hospedador	Proveedor	Dilución
Clone 9/C3g* de humano	Monoclonal, rata	Hycult	0,5 µg/ml
Anti-IgG de ratón conjugada con HRP	Policlonal, burro	Abcam	1:2500-5000
Anti-IgG de conejo conjugada con HRP	Policlonal, burro	Abcam	1:5000
Anti-IgG de cabra conjugada con HRP	Policlonal, conejo	Sigma	1:5000
Extravidina-HRP	/	Sigma	1:5000

* El anticuerpo Clone 9 se biotiniló usando SHN-LC-LC-Biotina de EZ-Link™ (Thermo Fisher Scientific)

La inmunotransferencia de FCI se realizó mediante la carga de 30 µl de sobrenadante sin diluir en tampón Laemmli a 4x (Tris-HCl 250 mM (a pH 6,8), SDS al 8 %, glicerol al 40 % y azul de bromofenol al 0,02 %) y separación de proteínas sobre un gel de poliacrilamida prefabricado al 10 % (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad) mediante transferencia semiseca tras lo cual se bloqueó la membrana en tampón de bloqueo (TBS a 1x a pH 8 [Sigma], Tween-20 al 0,05 % y polvo seco de leche desnatada al 5 % [Marvel]). El FCI se detectó con un OX21 (Tabla 1) y un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugada con HRP (Tabla 1) diluido en tampón de bloqueo. Las bandas de proteína se visualizaron usando el sustrato Clarity Western ECL (Bio-Rad) y se analizaron con un sistema de obtención de imágenes de Fc Odyssey®. La inmunotransferencia de GFP se realizó mediante la carga de 5 µl de sobrenadante no diluido en tampón Laemmli a 4x suplementado con 50 µl/ml de β-Mercaptoetanol. La inmunotransferencia se realizó tal como se describe anteriormente. La GFP se detectó con un anticuerpo para TurboGFP (Tabla 1) y un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugada con HRP (Tabla 1).

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

La Figura 3 muestra la inmunotransferencia de FCI (Figura 3A) y de GFP (Figura 3B). 3A: FCI aparece como una banda de 70 kDa (no reducida) y se expresó a las mismas tasas tras la transfección de ARPE-19 con pVAA.FCI o pVAA.FCloc. No se expresó FCI tras la transfección con pVAA. Se usó suero humano normal (SHN) al 10 % como un control positivo para la inmunotransferencia de FCI. 3B: Se analizó la eficacia de la transfección mediante cotransfección de células ARPE-19 con pCMV.GFP. GFP aparece como una banda de 30 kDa y la inmunotransferencia confirmó que las células se habían transfectado a eficacias similares.

Preparación de VAA.FCI y VAA.FCloc.

El virus VAA2 se preparó mediante transfección doble de las líneas celulares HEK-293 (ATCC® CRL-1573™) o HEK-293T (ATCC® CRL-3216™) (ambas adherentes) con pVAA.FCI o pVAA.FCloc y pDG (Plasmid Factory) proporcionando las secuencias auxiliares de adenovirus y las secuencias de empaquetamiento (Rep/Cap). Las células HEK-293 y HEK-293T se cultivaron en DMEM (Sigma) y se complementaron con suero bovino fetal inactivado por calor al 10 % (Gibco), L-Glutamina 200 mM al 1 % (Sigma Aldrich) y Penicilina-Estreptomicina al 1 % (Sigma Aldrich, 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina/ml). Las células se recolectaron tras 72 horas y se lisaron para purificar las partículas víricas. Las partículas víricas se purificaron sobre un gradiente de iodixanol y se recuperaron a partir de la fracción del 40 %. El virus se concentró sobre unidades de filtro de centrifuga Amicon Ultra-15 (Merck Millipore) y se almacenaron en alícuotas a -80 °C. La pureza del virus se evaluó mediante SDS PAGE y se determinó el título mediante PCRq.

Análisis de expresión in vitro de VAA.FCI, VAA.FCloc y VAA.GFP, transducción de las líneas celulares HEK-293 y ARPE-19, inmunotransferencia de sobrenadante de cultivo tisular para analizar la expresión de FCI.

Las líneas celulares HEK-293 ("293") y ARPE-19 con confluencia del 70 % se transdujeron con VAA.FCI, VAA.FCloc y VAA.GFP con una multiplicidad de infección (MDI) de 1×10^4 en medio de crecimiento normal complementado con solo suero bovino fetal inactivado por calor al 1 %. Después de 7 días, se recolectó el sobrenadante y se aclaró mediante centrifugación. El sobrenadante se almacenó en alícuotas a -80 °C.

La inmunotransferencia se realizó tal como se describe anteriormente y se mezclaron 30 µl de sobrenadante con tampón Laemmli a 4x y se cargaron en gel de poliacrilamida prefabricado al 10 %. El FCI se detectó con OX21 (Tabla 1) y anti-IgG de ratón conjugada con HRP (Tabla 1) diluido en tampón de bloqueo (cuando el sobrenadante se cargó en condiciones no reductoras) o un antisuero para el FCI humano (Tabla 1) y anticuerpo anti-IgG de cabra (molécula completa) - peroxidasa (Tabla 1) (cuando el sobrenadante se cargó en condiciones reductoras).

La Figura 4 muestra la inmunotransferencia de FCI en sobrenadante de las líneas celulares HEK-293 y ARPE-19 transducidas con virus. 4A: El sobrenadante se cargó en condiciones no reductoras y se detectó el FCI con un anticuerpo monoclonal de ratón para FCI humano (OX21, Thermo Fisher Scientific) y un anticuerpo anti-IgG de ratón en burro conjugado con HRP (Abcam). El FCI y el FCloc se expresaron en ambas líneas celulares. La transducción de las líneas celulares con VAA.GFP sirvió como un control negativo, mientras que 0,5 µg de FCI humano purificado en plasma (denominado "IFCpl" en el presente documento) (Comptech) sirvió como un control positivo. 4B: El sobrenadante se cargó en condiciones reductoras y se detectó el FCI con un antisuero de cabra para FCI humano

(Comptech) y anticuerpo anti-IgG de cabra en conejo (molécula completa) - peroxidasa (Sigma). El FCI apareció a 80 kDa (proenzima), a 50 kDa (procesado; cadena pesada) y a 35 kDa (procesado; cadena ligera). VAA.GFP sirvió como un control negativo mientras que 0,5 µg de FCI humano purificado en plasma (Comptech) y suero humano normal al 10 % (denominado "SHN" en el presente documento) sirvieron como un control positivo. El FCI y el FCloc se expresaron en ambas líneas celulares.

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

Para el análisis cualitativo, se inmunoprecipitó el FCI usando el kit de co-inmunoprecipitación (Co-IP) Pierce (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se incubaron 30 µg de anticuerpo monoclonal purificado por afinidad para FCI humano (Ox21, Thermo Fisher Scientific) durante 2 horas a temperatura ambiente con 25 µl de resina de acoplamiento AminoLink Plus. El sobrenadante de las células HEK-293 o ARPE-19 transducidas se incubó con la resina preparada durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, la resina se lavó varias veces usando el tampón de lisis/lavado de IP. El FCI unido se eluyó con el tampón de elución del kit (Glicina 0,1 M a pH 2,7) y se neutralizó inmediatamente con Tris 1 M, a pH 9,5. La inmunoprecipitación de FCI se evaluó mediante medición de la absorbancia a 280 nm y mediante análisis de SDS PAGE. El FCI se usó bien directamente en un ensayo de escisión de C3b o bien se almacenó en alícuotas a -80 °C.

En un ensayo de escisión de C3b, se incubó 1 mg de C3b purificado en plasma durante 1 hora a 37 °C con 0,5 µg de Factor del complemento H (FCH) y cualquiera de Factor del Complemento I purificado en plasma (FCIpl) (todas las proteínas purificadas en plasma se adquirieron de Comptech), sobrenadante de cultivo celular de células transducidas con VAA.IFC o IFC/IFCoc inmunoprecipitado. Se añadió tampón Laemmli a 4x con β-mercapto-etanol para detener la reacción. Las muestras se diluyeron y se cargaron sobre un gel de SDS PAGE de poliácridamida prefabricado al 10 % (Bio-Rad). Tras la transferencia a una membrana de PVDF (Bio-Rad) y el bloqueo en tampón de bloqueo (TBS a 1x a pH 8 [Sigma]/ Tween-20 al 0,05 % y polvo seco de leche desnatada al 5 % [Marvel]), la escisión de C3b se detectó con clone 9 biotinilado (Tabla 1) y conjugado con extravidina-HRP (Tabla 1). Este anticuerpo reacciona con un epítipo en C3g y sobre una SDS PAGE reductora reconoce la cadena α de C3, la cadena α' de C3b, la cadena C3α'1 de iC3b y C3dg. Puede, por lo tanto, usarse para analizar la degradación de C3b por FCI. FCH sirve como un cofactor para la degradación de C3b y porque el ensayo funciona a baja fuerza iónica, también sirve como un cofactor para la segunda escisión de iC3b a C3dg. El tampón usado fue "tampón de elución" del kit de coimmunoprecipitación (Co-IP) de Pierce (Thermo Fisher Scientific) neutralizado con Tris 1 M, a pH 9,5.

La Figura 5 muestra un resultado representativo de un ensayo de escisión de C3b. El carril 1 muestra C3b incubado solo con FCH. El carril 2 muestra C3b incubado con FCH y FCIpl. C3b se degrada mediante FCIpl a iC3b y C3dg. El carril 3 muestra C3b incubado con FCH y sobrenadante de HEK-293 transducido con VAA.IFC. El carril 4-5 muestra C3b incubado con FCH y FCI inmunoprecipitado (denominado "FCI IP") a partir de células ARPE-19 transducidas bien con VAA.FCI (carril 4) o con VAA.FCloc (carril 5). El carril 6-7 muestra C3b incubado con FCH y FCI inmunoprecipitado a partir de células HEK-293 transducidas bien con VAA.FCI (carril 6) o con VAA.FCloc (carril 7). El FCI secretado a partir de líneas celulares transducidas es funcionalmente activo y escinde la cadena α de C3b a iC3b. La inmunoprecipitación de FCI lleva a un aumento en la cantidad total de FCI que se refleja mediante la aparición de la banda de C3dg además de la banda del fragmento de α'1 de iC3b. Esta segunda escisión solo tiene lugar a baja fuerza iónica y a una baja tasa, que requiere más FCI para estar presente.

Análisis *in vitro* de la expresión de IFC en células ARPE-19 transducidas cultivadas sobre un filtro transpocillo permeable.

Las células del EPR son células pigmentadas indivisibles que presentan una polaridad morfológica cuando se colocan sobre filtros Transwell-COL recubiertos de lamina en medio con una baja concentración de suero. El filtro transpocillo (inserciones de membrana de poliéster, diámetro del poro de 0,4 µm, diámetro de membrana de 12 mm) sirve para separar los pocillos del cultivo en dos compartimentos, el dominio apical (superior) que se corresponde con el lado de la monocapa de EPR que mira hacia la retina y el dominio basolateral (inferior) que se corresponde con el lado de la monocapa del EPR que mira hacia la coroides. Cuando se dejan en condiciones de medio bajo en suero, las células ARPE-19 se diferenciarán y llegarán a ser células hexagonales ligeramente pigmentadas. El modelo transpocillo se puede usar para evaluar la expresión en células quiescentes, para reflejar la situación *in vivo*.

Los transpocillos se recubrieron con 8 µg/ml de laminina (Sigma) y las células ARPE-19 se cultivaron en medio de FBS al 10 % como monocapas sobre transpocillos. Tras 48 horas se cambió el medio a medio de FBS al 1 % y las células se transdujeron con una MDI de 10⁵/célula (VAA.FCI, VAA.FCloc y VAA.GFP). Tras 7 días se recolectó el sobrenadante de ambos compartimentos y se aclaró mediante centrifugación. Debido al diferente volumen en el compartimento superior e inferior, es decir 500 µl de medio en el compartimento superior y 1500 µl en el compartimento inferior, se analizó el sobrenadante normalizado al volumen total: se mezclaron 30 µl de sobrenadante del compartimento inferior con tampón Laemmli a 4x y 10 µl de sobrenadante del compartimento superior se mezclaron con tampón Laemmli a 4x. Las muestras se cargaron sobre un gel de poliácridamida prefabricado al 10 %. El FCI se detectó con un OX21 (Tabla 1) y un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Tabla 1) diluido en tampón de bloqueo. Para la tinción de los núcleos, las células se lavaron 2 veces con PBS (Gibco) y se fijaron durante 15 minutos con paraformaldehído al 4 % (Sigma) 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 1:5000 en tampón de permeabilización durante 15 minutos y se evaluó la tinción de los núcleos.

La Figura 6 muestra la inmunotransferencia de FCI secretado a partir de células ARPE-19 cultivadas en transpocillo. 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: El sobrenadante de ambos compartimentos se cargó en condiciones no reductoras y se realizó un análisis por transferencia de Western usando un monoclonal de ratón para FCI (Ap=compartimento apical y Bl=compartimento basolateral). Se demuestra que FCI se está expresando a partir de una monocapa confluyente de células y que las proteínas secretadas se detectan en ambos compartimentos. 6B: La tinción con Hoechst de los núcleos se realizó para confirmar la presencia de una monocapa de células (la tinción se realizó tras la recolección del sobrenadante).

Análisis de expresión in vivo de VAA.FCI y VAA.FCloc, inyección subretiniana de ratones C57/Black 6, análisis de la expresión de FCI mediante inmunotransferencia, PCRq e inmunohistoquímica.

Inyecciones subretinianas

Para todos los experimentos se usaron ratones C57BL/6J hembra de 8-10 semanas de vida (Charles River Laboratories). Todos los animales usados en este estudio se trataron humanamente de acuerdo con el Reglamento del Ministerio del Interior del Reino Unido bajo la licencia del proyecto 30/3363. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de 12:12 horas de luz/oscuridad.

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

A los ratones se les inyectaron dos dosis diferentes (10^7 copias de genoma [cg]/ojo y 10^8 cg/ojo) y dos construcciones de VAA (VAA.FCI y VAA.FCloc). Se inyectaron a tres ratones con una tercera dosis, 10^9 cg/ojo de VAA.IFCoc; estos ratones se usaron para la calibración de las inmunotransferencias. El virus se diluyó en PF68 al 0,001 % (Gibco) en PBS (Gibco) y las inyecciones de simulación se realizaron usando el mismo diluyente. Se inyectaron 12 ojos por condición por vía subretiniana.

Preparación de muestras del tejido para inmunotransferencia de FCI

Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical 4 semanas después de la inyección. Los ojos se extirparon y se prepararon tal como sigue. Se realizó una incisión en la córnea usando un microscopio de disección. El ojo se divide en córnea/iris (segmento anterior), lente, y cúpula óptica posterior. Para una muestra de cúpula óptica completa, la cúpula óptica posterior se coloca en un tubo estéril. Para algunos ojos, la retina y el EPR/coroides/esclerótica se separaron retirando suavemente la retina del complejo EPR/coroides/esclerótica. Las muestras de los tres ratones por condición se agruparon (Figura 7A), salvo en los ojos inyectados con 10^9 cg/ojo de VAA.FCloc (Figura 7B) en donde se agruparon las muestras de dos ratones y se compararon con el ojo contralateral no inyectado. Todas las muestras se pusieron inmediatamente sobre 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 1xRIPA (Merck Millipore) complementado con mezcla de inhibidor de proteasa sin EDTA complete™ (Roche) y las células se rompieron mecánicamente mediante mortero y mediante ultrasonidos. La proteína insoluble se centrifugó y se almacenó el sobrenadante en alícuotas y se mantuvo a -80 °C. Se determinó la concentración de proteínas usando el kit de ensayo de proteína de BCA de Pierce (Thermo Fisher Scientific) y se cargaron 40 µg de lisado de proteína en tampón Laemmli a 4x (Tris-HCl 250 mM (a pH 6,8), SDS al 8 %, glicerol al 40 % y azul de bromofenol al 0,02 %). Las proteínas se separaron sobre un gel de poliacrilamida prefabricado al 10 % (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad) mediante transferencia semiseca tras lo cual se bloqueó la membrana en tampón de bloqueo (TBS a 1x a pH 8 [Sigma], Tween-20 al 0,05 % y polvo seco de leche desnatada al 5 % [Marvel]). El FCI se detectó con a) reducido: antisuero para FCI humano (Tabla 1) y anti-IgG de cabra conjugada con HRP (Tabla 1) o b) no reducido: OX21 (Tabla 1) y anticuerpo anti-IgG de ratón en burro conjugado con HRP (Abcam) diluido en tampón de bloqueo. Para la detección de actina β, la membrana se eliminó usando tampón de eliminación de restauración de análisis por transferencia de Western (Thermo Fisher Scientific) y se reproboó usando anti-actina-β (Tabla 1) y anticuerpo anti-IgG de ratón conjugada con HRP (Tabla 1) diluido en tampón de bloqueo. Como alternativa, el anticuerpo anti-actina-β de ratón se usó en combinación con antisuero de cabra para FCI.

La Figura 7 muestra la expresión de la proteína del FCI de las muestras agrupadas analizada mediante inmunotransferencia. El FCI se expresa a niveles detectables a todas las dosis y a partir de VAA.IFC y VAA.IFCoc. La actina β se cargó como un control de la carga. 7A: se cargaron 40 μ g de lisado de proteína en condiciones reductoras y se detectó el FCI con un antisuero policlonal de cabra para el FCI humano. El FCI se detectó como 80 kDa (proenzima), 50 kDa (procesado; cadena pesada) y 35 kDa (procesado; cadena ligera). Estas bandas se corresponden con el tamaño esperado de FCI y confirman el procesamiento, es decir, la presencia de las cadenas pesada y ligera. 7B: También se cargó la misma cantidad de lisado de proteína para muestras de lisado de ojos inyectados con 10^9 cg/ojo de VAA.FCloc u ojos no inyectados. El FCI se detectó con un monoclonal de ratón para FCI (izquierda, gel no reductor) y antisuero de cabra para FCI (derecha, gel reductor). El gel no reductor (izquierda) detecta FCI como una banda a 75 kDa en animales inyectados y no se detectan bandas en los animales no inyectados. En el gel reductor (derecha), el FCI aparece como 80 kDa (proenzima), 50 kDa (procesado; cadena pesada) y 35 kDa (procesado; cadena ligera).

Preparación de muestras del tejido para análisis de expresión génica

Los ratones se sacrificaron tal como se describe anteriormente y se dejaron intactas las cúpulas ópticas posteriores o se separó la retina y el EPR tal como se describe anteriormente. Las muestras de tejido se pusieron inmediatamente en tubos estériles que contienen RNALater (Thermo Fisher Scientific). Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta el procesamiento posterior. El ARN se aisló usando el mini kit RNeasy (Qiagen) y se homogeneizó el tejido usando el mortero en tampón RLT (proporcionado con el kit). Se añadió un tratamiento complementario con DNasa sin RNasa (Qiagen) para asegurar la ausencia de ADN genómico. Se retrotranscribieron 100 ng de ARN a ADNc usando el kit de síntesis de primera hebra Superscript III (Thermo Fisher Scientific). Tras la retrotranscripción, la reacción se lavó usando el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen). Se llevó a cabo una PCRq sobre ADNc de un ojo por condición (simulación, FCI a 10^7 cg/ojo, FCI a 10^8 cg/ojo, FCloc a 10^7 cg/ojo y FCloc a 10^8 cg/ojo) usando un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX Connect™ (Bio-Rad). Se usaron 1,25 ng de ADNc por pocillo como molde para las reacciones de PCRq con una mezcla de SYBR green master (iTaQ Universal SYBR Green Supermix, Bio Rad). Cada condición se realizó por triplicado; los valores de Ct se obtuvieron usando el programa informático proporcionado. El análisis comparativo de $\Delta\Delta$ Ct con actina beta de ratón como gen constitutivo se usó para determinar la expresión relativa de FCI para controles de simulación.

La Figura 8 muestra el análisis de expresión génica mediante PCRq. Tal como se esperaba, no hubo expresión de FCI o FCloc de humano en ratones con inyección de simulación. Dado que solo se analizó un ojo por condición, no se pudieron realizar análisis estadísticos. FCI se expresa a partir de ambas construcciones de VAA y la expresión aparentemente tiene lugar predominantemente en el EPR, sin embargo, la inyección de 10^8 cg/ojo lleva a una elevada expresión de ARNm del FCI en el tejido retiniano. En la muestra de la cúpula óptica, la cantidad de ARNm del IFC para el ARNm total de la cúpula óptica se espera que sea más pequeña que en solo EPR, porque muchas áreas del ojo no tendrán expresión de FCI; esto se refleja mediante los resultados.

Preparación de secciones retinianas para inmunohistoquímica

Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical (4 semanas después de la inyección). Los ojos se extirparon y se prepararon tal como sigue. Se hizo un orificio justo detrás de la ora serrata y el globo ocular se colocó en paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato 0,12 M, a pH 7,2 durante 1 hora a temperatura ambiente. Los inventores entonces retiraron el segmento anterior y la lente y prepararon el ojo para secciones o montaje completo. Las cúpulas ópticas usadas para secciones se crioconservaron con concentraciones en aumento de sacarosa en tampón fosfato 0,12 M, a pH 7,2 (10 % durante 1 hora a temperatura ambiente y el 30 % durante toda la noche a +4 °C), introducidas en OCT (Tissue-tek, Sakura Finetek USA inc, Ca, EEUU) y se congelaron en un molde a -80 °C. Las secciones se cortaron a un espesor de 10 μ m sobre un criostato y se montaron en portaobjetos de cristal (Super-Frost, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Los portaobjetos se secaron al aire durante 2 horas a temperatura ambiente y se almacenaron a -80 °C. Para las cúpulas ópticas usadas para los montajes completos, la retina y el EPR/coroides se separaron retirando suavemente la retina del EPR y almacenándolos por separado en PBS a +4 °C.

Inmunotinción

Las secciones se bloquearon y se impermeabilizaron mediante incubación a temperatura ambiente durante 60 minutos en solución PBSGT (gelatina al 0,2 % (p/v), Triton X-100 al 0,25 % (v/v) en PBS). Los montajes completos se bloquearon y se impermeabilizaron 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 PBSGT toda la noche a temperatura ambiente. Tras el lavado 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, EEUU) a una dilución de 1:5000 y se tiñeron con DAPI en solución PBSGT durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron con solución PBST y posteriormente se recubrieron con medio de montaje (Mowiol, Merck Millipore).

Tabla 2. Anticuerpos primarios usados en inmunohistoquímica en el presente estudio.

Anticuerpo	Número de parte	Empresa	Dilución
anti-hFCI 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 hFCI en secciones retinianas de ojos inyectados con simulación, VAA.FCI y VAA.FCloc. La fibronectina se usa como un comarcador para distinguir las diferentes capas retinianas. Tanto para los ojos inyectados con VAA.FCI como para los inyectados con VAA.FCloc, hFCI se localiza en varios compartimentos: ligeramente en la esclerótica (Escl), fuertemente en el EPR, el segmento externo (SE) e interno (SI) de los fotorreceptores, la capa plexiforme externa (CPE) y presumiblemente en la capa de células ganglionares (CCG) y en la capa de fibra nerviosa (CFN). Una ligera señal en CCG + CFN es visible para los ojos con inyección de simulación, lo que demuestra que el anticuerpo no es completamente específico en esas capas.
- Las Figuras 10 a 13 muestran una mayor aumento de las diferentes regiones en las que hFCI se localiza en secciones retinianas de ojos inyectados con simulación y VAA.FCI. Se observa la misma señal para secciones retinianas de ojos inyectados con VAA.IFCoc y no se muestran.
- La Figura 10 muestra un mayor aumento de la región de EPR para secciones retinianas de ojos inyectados con simulación y VAA.FCI. hFCI se localiza en toda la capa de EPR y en las microvellosidades del EPR. La tinción es vesicular, lo que sugiere una localización de hFCI en la ruta secretora.
- La Figura 11 muestra un mayor aumento de la región del fotorreceptor para secciones retinianas de ojos inyectados con simulación y VAA.FCI. hFCI se localiza en los segmentos internos y externos de los fotorreceptores pero no estaba presente en la región nuclear/del retículo endoplásmico de los fotorreceptores.
- La Figura 12 muestra un mayor aumento de la capa plexiforme externa para secciones retinianas de ojos inyectados con simulación y VAA.FCI. hFCI se localiza en los cuerpos celulares, lo que sugiere una tinción de células horizontales. En ausencia de un marcador de células horizontales, 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 un mayor aumento de la región de la capa de células ganglionares para secciones retinianas de ojos inyectados con simulación y VAA.FCI. Aunque la intensidad en la capa de la fibra nerviosa para hFCI que marca en secciones retinianas de ojos inyectados con VAA.FCI parece ser mayor a la intensidad para secciones retinianas de ojos inyectados con simulación, es difícil determinar si hFCI se localiza en la capa de fibra nerviosa.
- La Figura 14 muestra la localización de fibronectina y de hFCI en EPR de montaje completo de ojos inyectados con simulación, VAA.FCI y VAA.FCloc. Tanto para los ojos inyectados con VAA.FCI como para los inyectados con VAA.FCloc, hFCI se localiza en células del EPR. La tinción está puntuada y parece que se localiza en vesículas de la ruta secretora donde se procesa hFCI.
- Ejemplo 2
- Ensayo funcional in vivo de la capacidad de VAA.FCI o de VAA.FCloc para mitigar el daño a la retina inducido por la luz
- Los ratones albinos BALB/c se alojaron en la Instalación de Cuidado de Animales en un ciclo de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad con acceso a comida y agua a voluntad. La intensidad de luz del ambiente a nivel ocular de los animales es 85 ± 18 lux. Todos los experimentos se llevan a cabo de acuerdo con la Declaración de ARVO para el Uso de Animales en Oftalmología y la Investigación de la Visión y son 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) los ratones adultos (aproximadamente de 1 año de edad) se trasladan a una sala de tratamiento con luz y se adaptan a la oscuridad durante la noche. Los animales se alojan a razón de dos animales por jaula de vidrio acrílico transparente (plexiglás; Rohm y Haas) con libre acceso a comida 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) colgadas aproximadamente 40 cm por encima de las jaulas. La intensidad de luz se mide usando un medidor de luz (Extech Instruments, Waltham, MA) para asegurar que se proporciona 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 del complemento I (FCI) en la pérdida inducida por luz de las neuronas retinianas externas, los ratones se exponen a inyección de FCI-VAA.FCI (o VAA.FCloc), GFP-VAA.GFP o de simulación mediante la vía subretiniana. Se usan típicamente cohortes de 6-8 ratones. Tras 3-4 semanas de exposición a VAA, se inicia el daño inducido por luz tal como se detalla anteriormente. Después de 2-3 semanas, se realiza la electrorretinografía (ERG). Los animales se anestesiaron usando xilazina y ketamina (20 y 80 mg/kg, respectivamente) y se dilataron sus pupilas con 1 gota de HCl de fenilefrina (2,5 %) y sulfato de atropina (1 %) y se colocaron sobre un bloque de calor que se mantiene a 37 °C en una jaula de Faraday hermética a la luz. La estimulación de luz se proporciona utilizando la configuración de ERG proporcionada por el 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 luz por 10-ms de flash proporcionada en la ruta del estímulo puede variar en las etapas de 0,3 unidades de log desde $3,0 \times 10^5$ hasta $3,0 \times 10^{11}$ fotones/mm². Los electrorretinogramas escópicos se registran en respuesta a la estimulación con un solo flash de intensidades de luz crecientes, con un promedio de tres a cinco respuestas. La amplitud del pico de la onda a se mide desde las condiciones de partida hasta la tensión negativa inicial, mientras que la amplitud del pico de la onda b se mide desde la depresión del valle de la onda a hasta el pico de la onda b positiva. Tras el ERG, se obtienen los ojos de los ratones y se procesan para histología usando tinción de hematoxilina y eosina y se cuantifica el espesor de las capas nucleares retinianas externas.

La expectativa es que la reducción de la actividad de la vía alternativa del complemento mediante la exposición a FCI-VAA.FCI / VAA.FCloc preservará la función de ERG y reducirá la pérdida de neuronas retinianas externas.

En resumen, el virus adenoasociado es un vehículo eficaz para permitir la expresión sostenida del Factor del complemento I, un regulador de la ruta alternativa del complemento. Se ha descubierto que, sorprendentemente, el FCI administrado mediante VAA se expresa, se procesa correctamente y se secreta de forma funcionalmente activa en células de EPR tanto activas como confluentes. Estos datos demuestran que el EPR humano contiene las convertasas de proproteína requeridas para segregar FCI en forma funcional. En experimentos de traducción con animales, la administración subretiniana de FCI.VAA lleva a la expresión fácilmente detectable de una forma procesada de manera funcional de hFCI producida mediante células de EPR de ratón. La inmunotinción también sugiere que a pesar de la ausencia de la expresión intracelular de hFCI en fotorreceptor de ratón, la proteína estaba presente en la región del segmento interno y externo de los fotorreceptores, lo que sugiere que el hFCI secretado en EPR se difunde y probablemente podría desempeñar su importante papel regulador de la ruta del complemento en una amplia región de la coriorretina. Teniendo en cuenta los datos que relacionan la desregulación del complemento con la degeneración macular asociada a la edad, esta nueva estrategia terapéutica podría desempeñar un papel fundamental en el tratamiento sostenido de esta afección de ceguera.

REIVINDICACIONES

1. Un vector de virus adenoasociado (VAA) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o un fragmento del mismo, en donde el fragmento es capaz de escindir C3b en iC3b.
2. El vector de VAA de la reivindicación 1, en donde 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 el 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 1 o 9;
 - (b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 70 % de identidad con la SEQ ID NO: 2 o 8; y
 - (c) la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2 o 8.
3. El vector de VAA de la reivindicación 1 o 2, en donde el vector del virus está en forma de una partícula vírica.
4. El vector de VAA de la reivindicación 3, en donde la partícula vírica de VAA comprende un genoma de VAA2 y proteínas de la cápside de VAA2.
5. El vector de VAA de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la secuencia de nucleótidos que codifica el Factor I o el fragmento del mismo está unida de manera operativa a un promotor de CAG, preferentemente un promotor con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5.
6. Una célula aislada transfectada con y que comprende el vector de VAA de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Una composición farmacéutica que comprende el vector de VAA de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la célula aislada de la reivindicación 6 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente.
8. El vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en el tratamiento o en la prevención de un trastorno del ojo mediado por el complemento.
9. El vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el trastorno es la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) o la retinopatía diabética, preferentemente DMAE.
10. El vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la DMAE es DMAE seca.
11. El vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde la formación de atrofia geográfica se previene o se reduce, y/o se reduce la cantidad de atrofia geográfica.
12. El vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde se ralentiza la progresión de atrofia geográfica.
13. El vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde hay al menos un 10 % de reducción en el aumento en el área de atrofia geográfica durante los 12 meses tras la administración a un ojo tratado de un sujeto, en relación con un ojo sin tratar durante el mismo período.
14. El vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en donde la administración del vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica aumenta el nivel de actividad de inactivación de C3b y degradación de iC3b en un sujeto o en un ojo, tal como en el epitelio pigmentario retinal (EPR), de un sujeto, opcionalmente hasta un nivel que supera un nivel normal en un sujeto u ojo o EPR del mismo.
15. El vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-14, en donde el vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica se administra por vía intraocular.
16. El vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-15, en donde el vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica se administra al ojo de un sujeto mediante inyección subretiniana, retiniana directa, supracoroidea o intravítrea.

17. El vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-16, en donde el vector de VAA, la célula aislada o la composición farmacéutica se administra al ojo de un sujeto mediante inyección subretiniana.

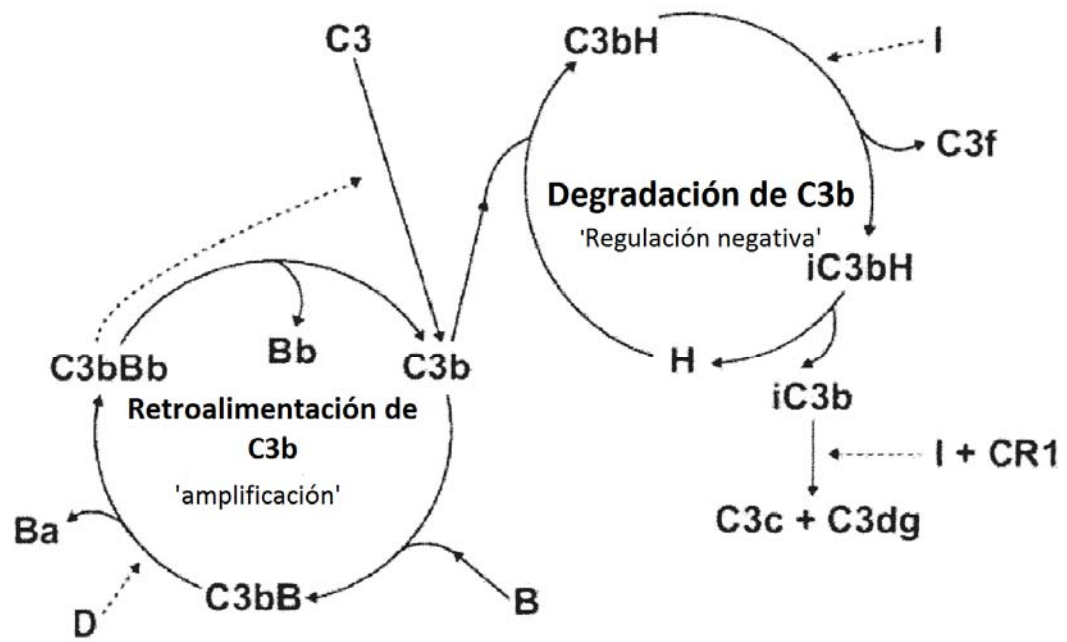


Figura 1

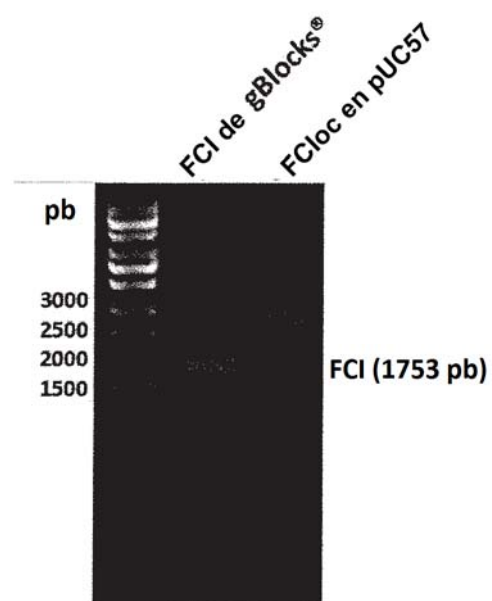


Figura 2

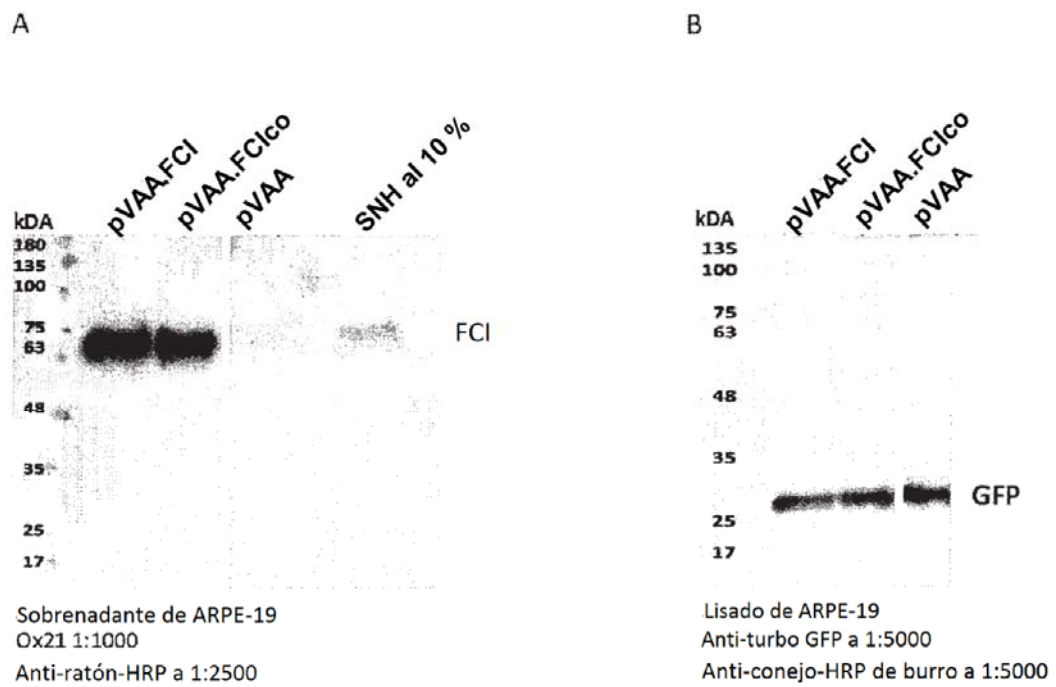
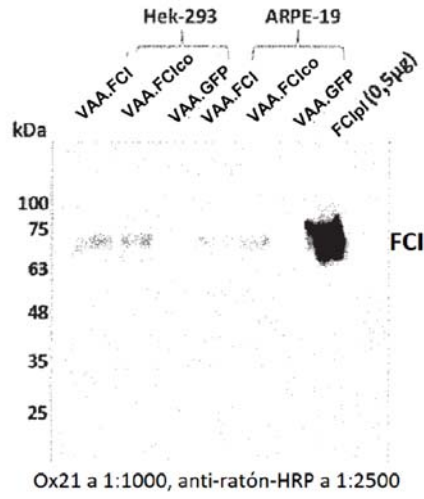


Figura 3

A



B

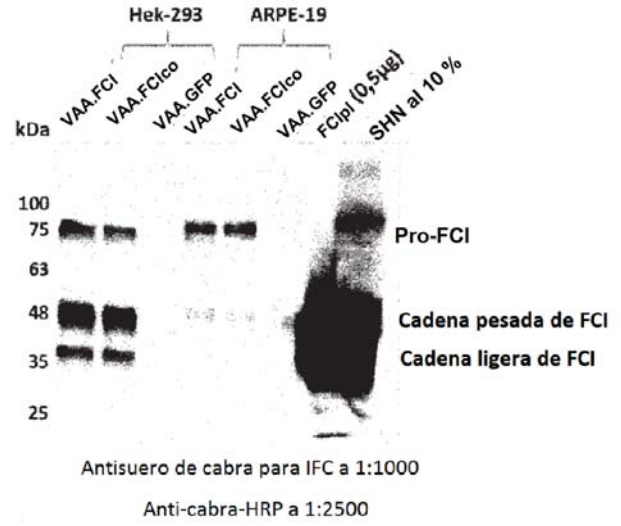


Figura 4

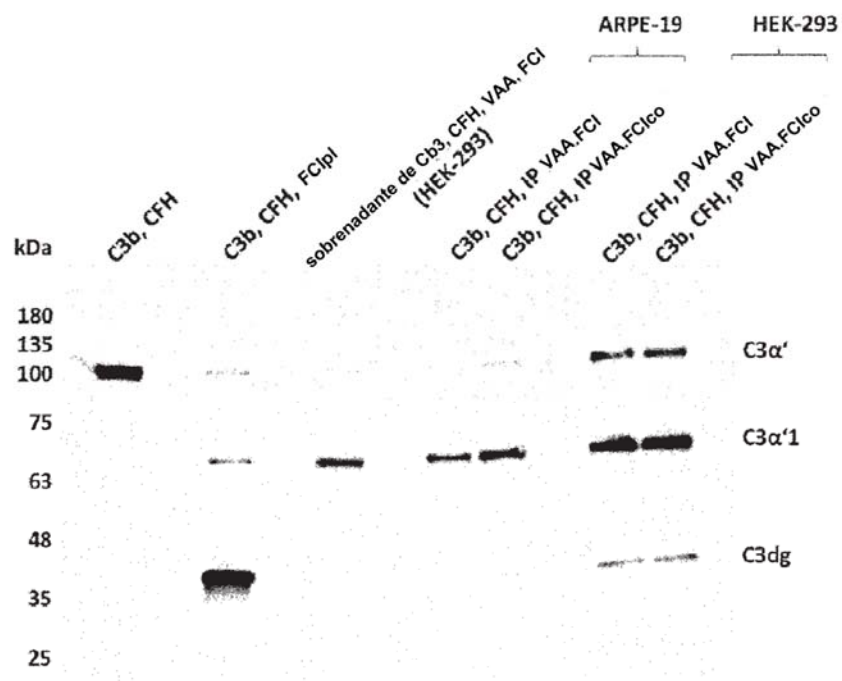
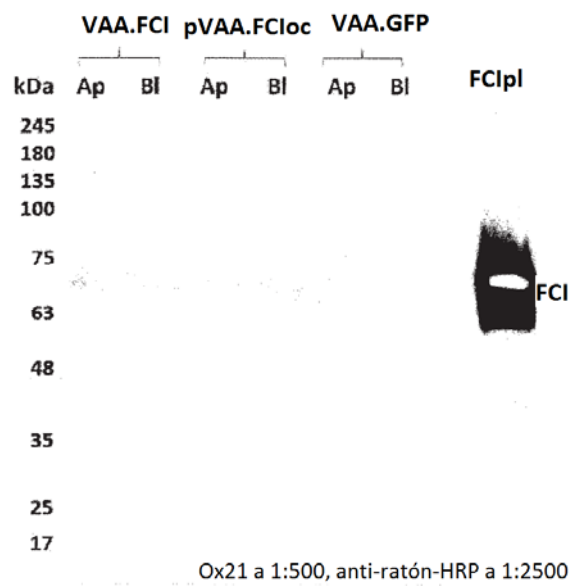


Figura 5

A



B

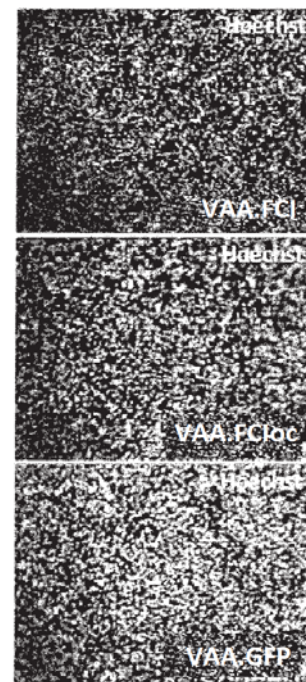
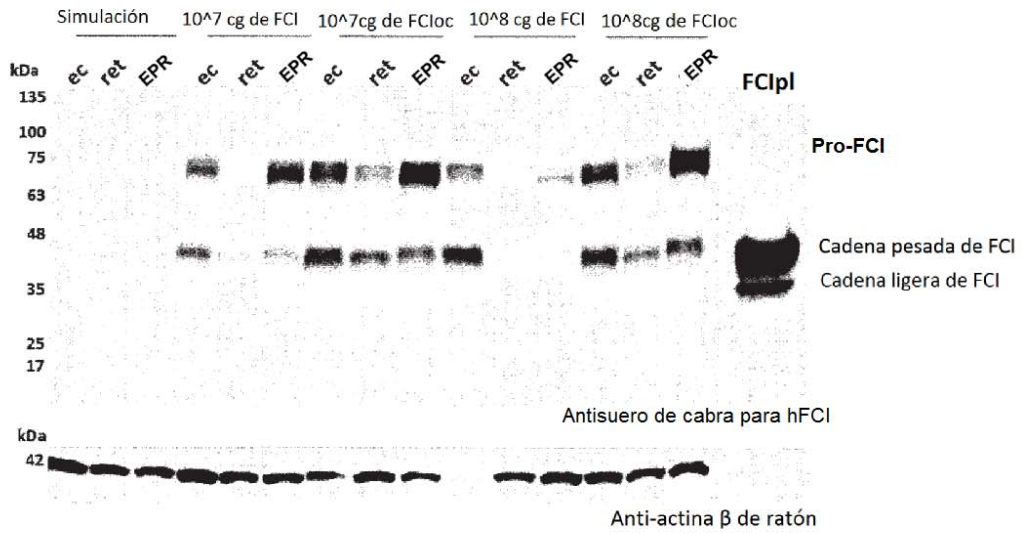


Figura 6

A



B

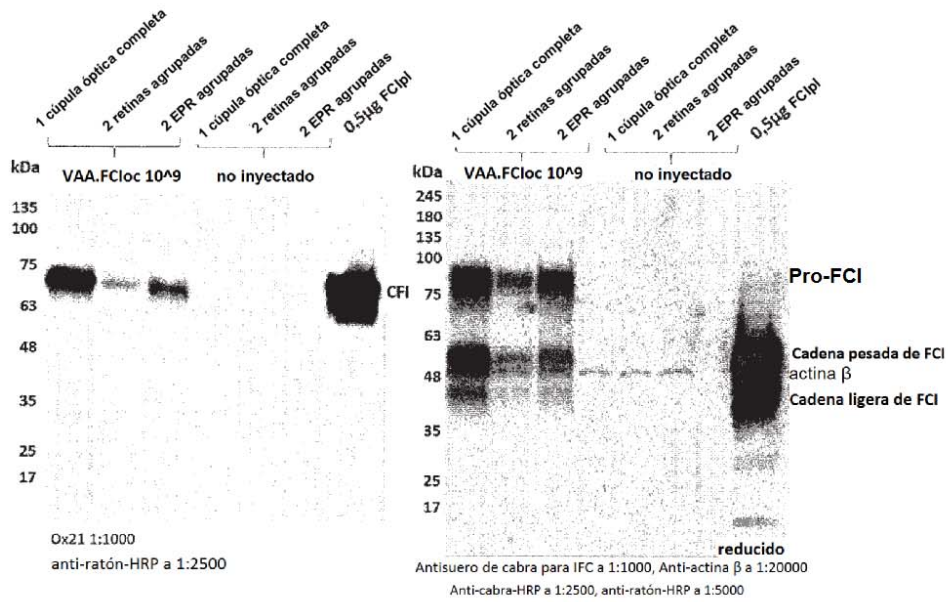


Figura 7

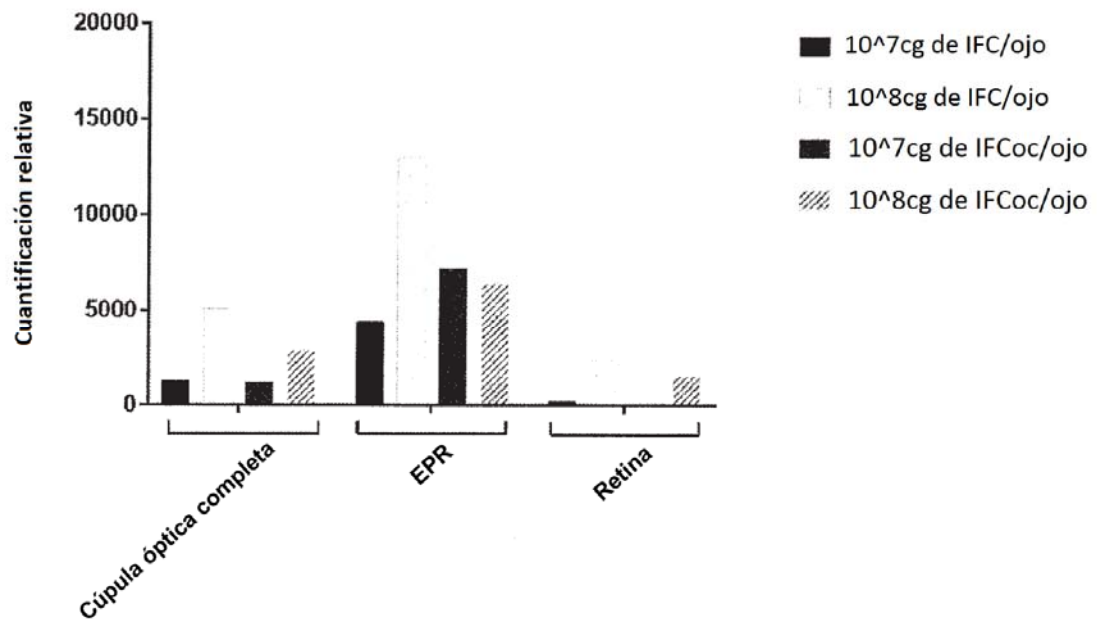


Figura 8

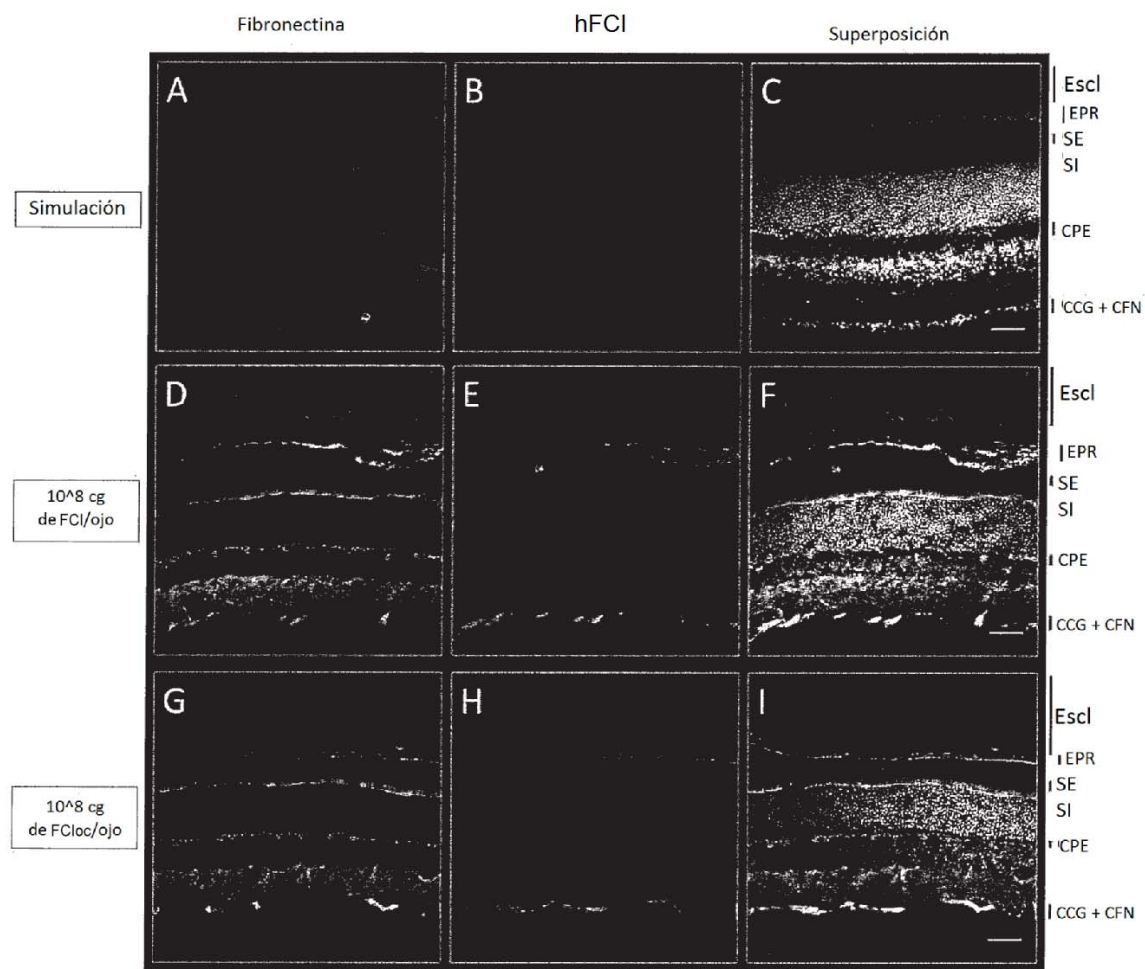


Figura 9

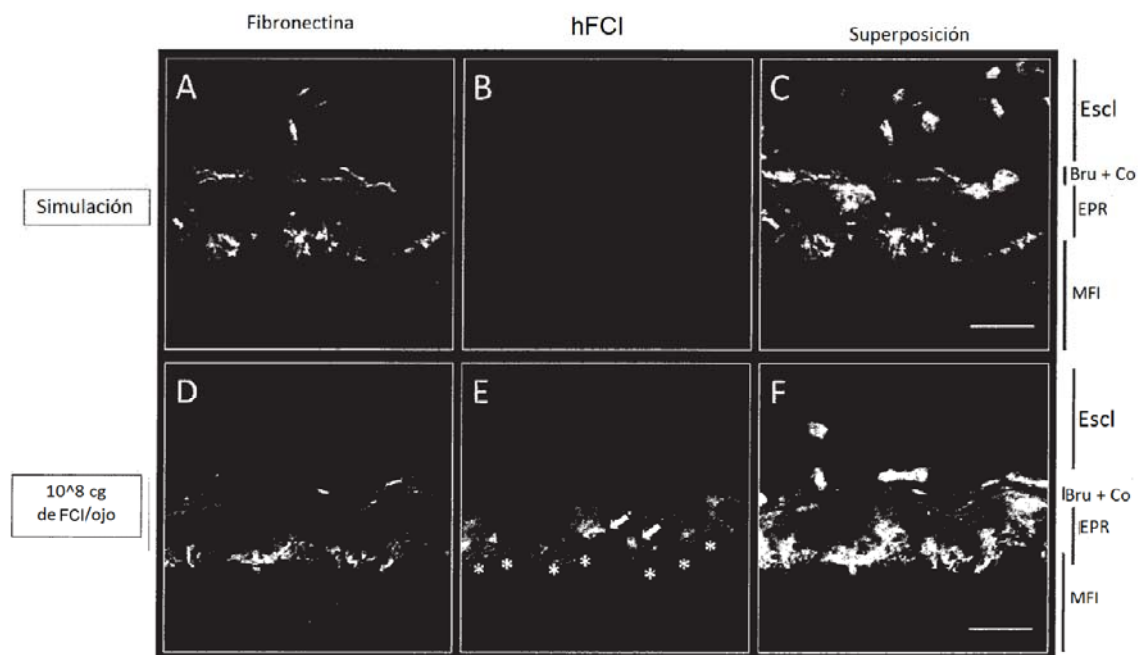


Figura 10

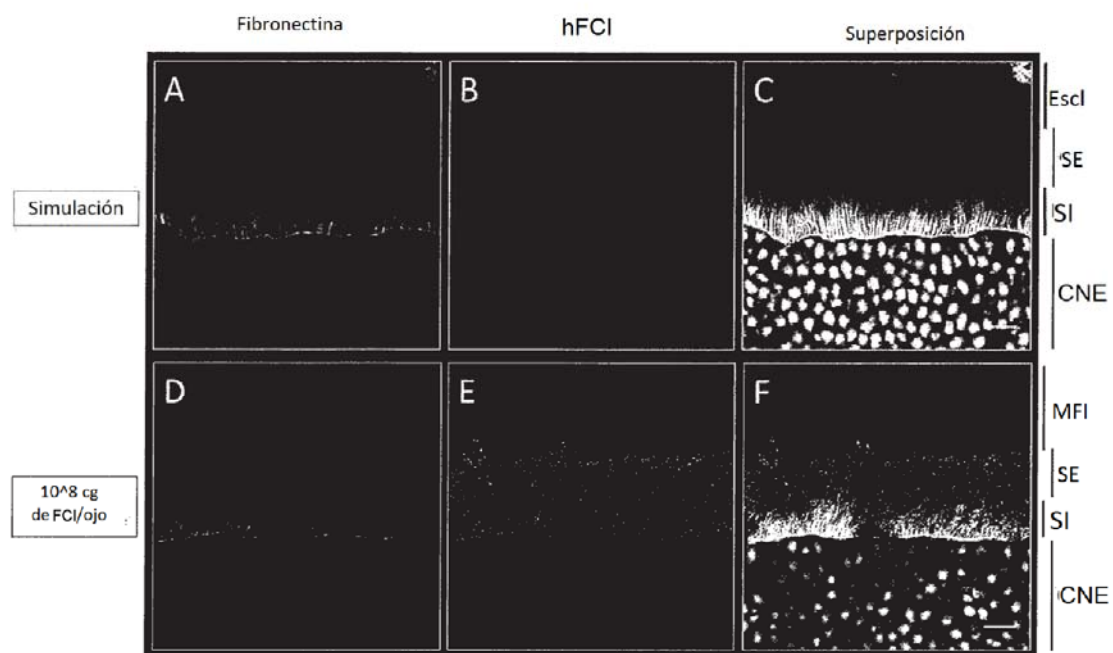


Figura 11

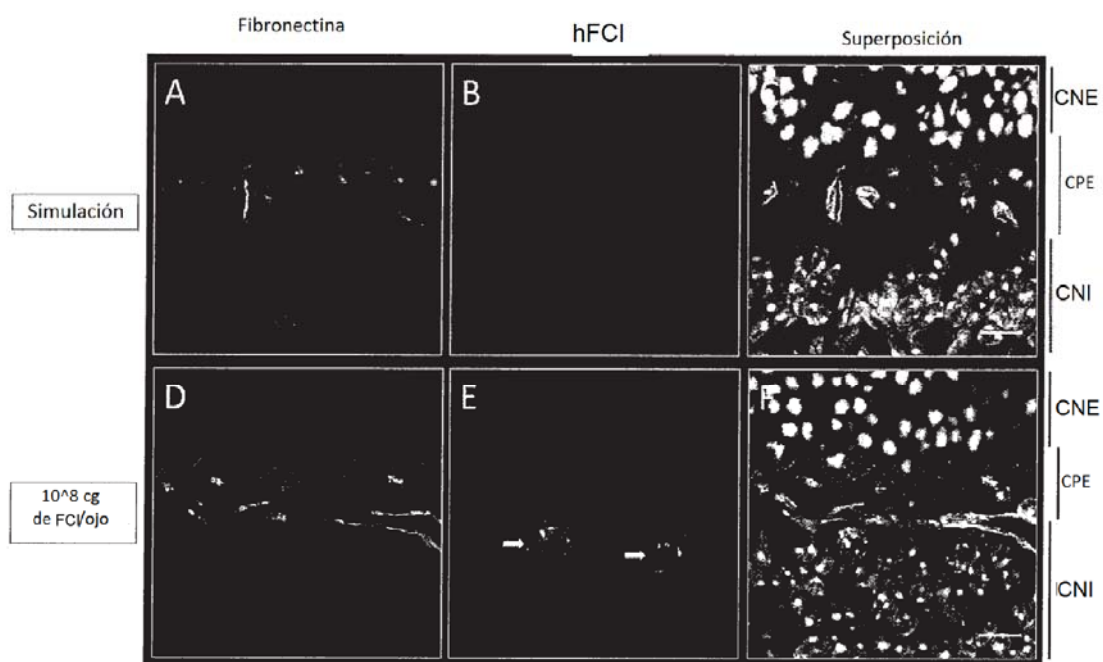


Figura 12

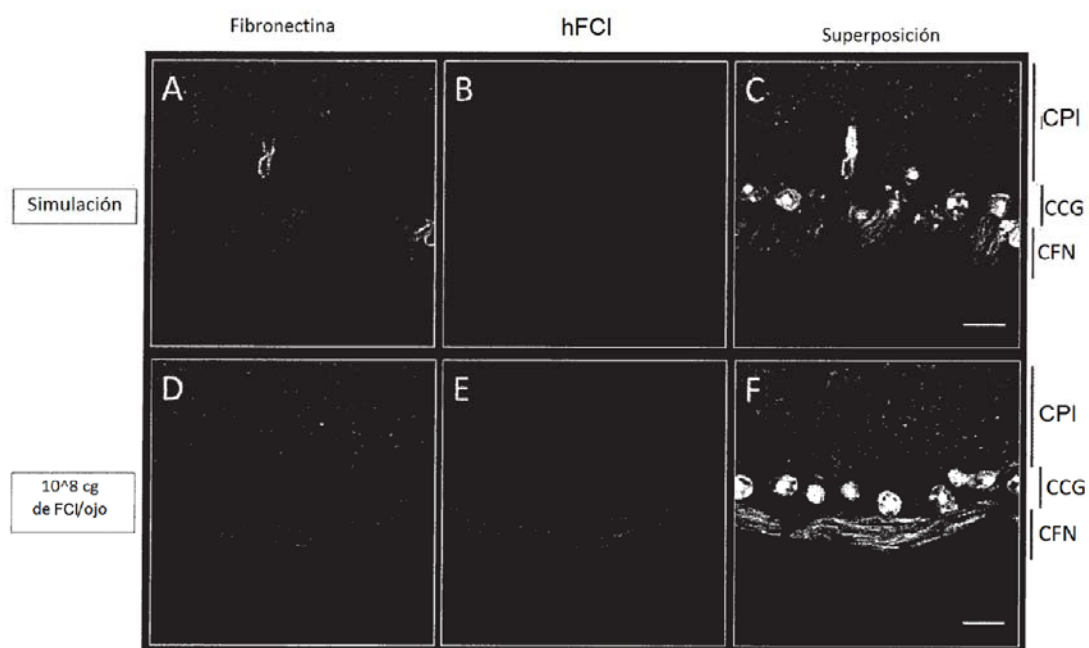


Figura 13

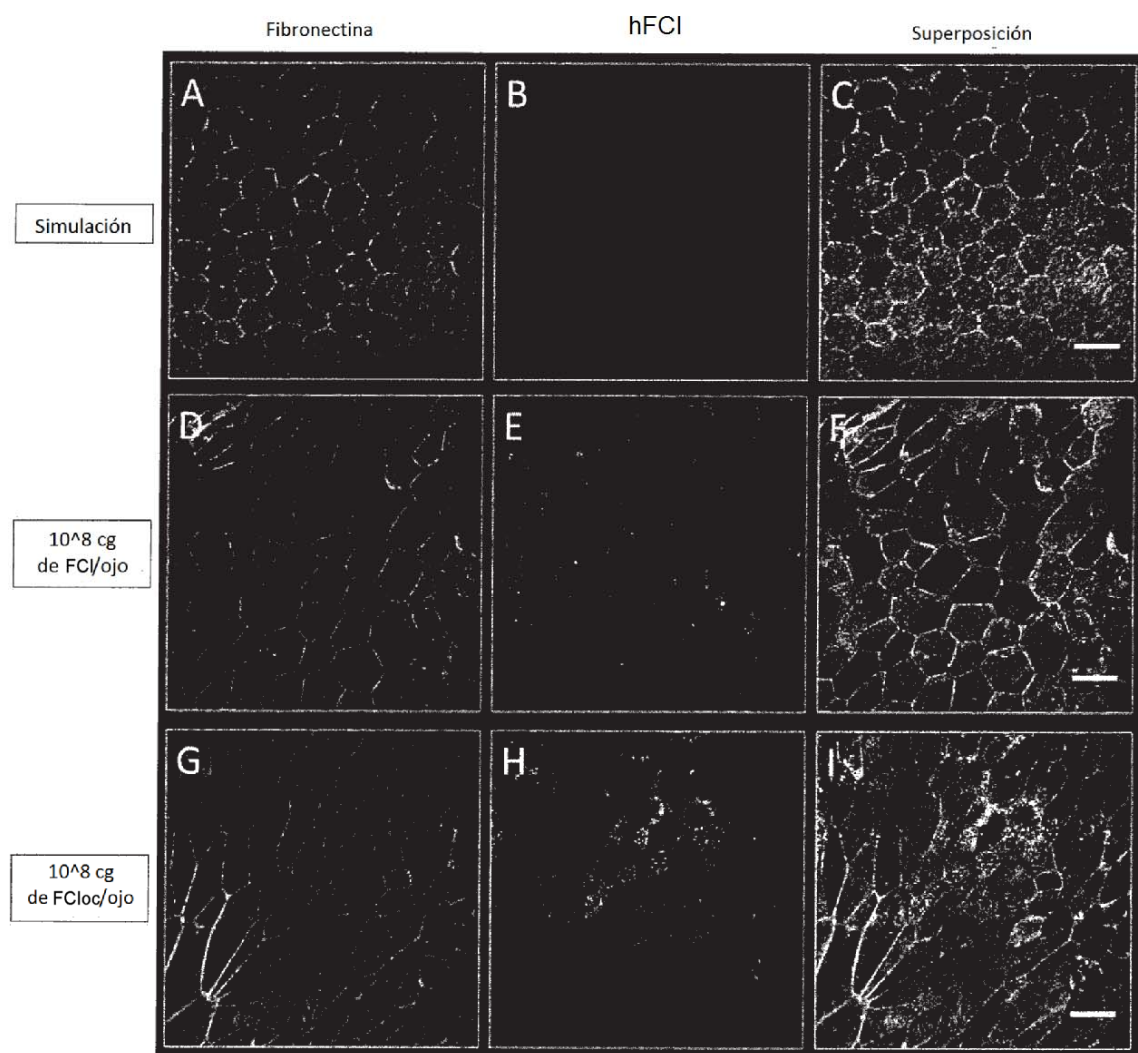


Figura 14