

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 828**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/22 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2018** **PCT/IB2018/055755**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2019** **WO19025984**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2018** **E 18842071 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2024** **EP 3662066**

54 Título: **Modelos celulares y terapias para enfermedades oculares**

30 Prioridad:

31.07.2017 US 201762539473 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2024

73 Titular/es:

REFLECTION BIOTECHNOLOGIES LIMITED
(100.0%)

Unit 601, 6/F, Core Building 1No. 1 Science Park
East AvenuePak Shek KokNew Territories
Hong Kong SAR, HK

72 Inventor/es:

YANG, RICHARD R. y
TSANG, STEPHEN H.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 985 828 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

Modelos celulares y terapias para enfermedades oculares

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica la prioridad a tenor de 35 U.S.C. § 119(e) de la Solicitud de los EE. UU. n.º 62/539.473 titulada "MODELOS CELULARES Y TERAPIAS PARA ENFERMEDADES OCULARES" presentada el 31 de julio de 2017.

10 ANTECEDENTES

Distrofia del cristalino de Bietti (BCD)

15 La distrofia del cristalino de Bietti (BCD, por sus siglas en inglés, también conocida como distrofia comeorretiniana del cristalino de Bietti, retinopatía del cristalino de Bietti, distrofia retiniana de Bietti (OMIM 210370)) es una distrofia retiniana autosómica recesiva rara y cegadora caracterizada por numerosos depósitos diminutos y brillantes similares a cristales de color blanco amarillento en el polo posterior de la retina, asociada a atrofia del epitelio pigmentario retiniano (RPE, por sus siglas en inglés), cúmulos de pigmentos y esclerosis coroidea. Fue identificada por primera vez por el Dr. G.B. Bietti en 1937. Las fotografías del fondo de ojo y las imágenes SD-OCT de pacientes con BCD demostraron que los depósitos cristalinos estaban ubicados principalmente en el lado 20 retiniano del epitelio pigmentario retiniano (RPE). (H. Kojima, A. Otani, K. Ogino *et al.*, "Outer retinal circular structures in patients with Bietti crystalline retinopathy", *British Journal of Ophthalmology*, vol. 96, págs. 390-393, 2012). Se estima que entre un cuarto y un tercio de las personas con BCD tienen depósitos cristalinos en el limbo corneal (Kaiser-Kupfer *et al.* *Clinical biochemical and pathologic correlations in Bietti's crystalline dystrophy*, *Am J Ophthalmol.*, 1994, 118:569-82). En algunos casos, también se observan depósitos de cristales en el cristalino (Chung *et al.*, *J. Ophthalmol.* 57:447-450, 2013). En fases avanzadas, los pacientes con BCD tienen esclerosis coroidea avanzada, disminución o ausencia de depósitos cristalinos y atenuación de los vasos retinianos (Wada *et al.* *Am J Ophthalmol* 2005; 139:894-9). También hay presente ERG anormal y adelgazamiento de la retina en la 30 BCD.

Clínicamente, la BCD es progresiva y se asocia a distrofia y degeneración del RPE. Es común una asimetría marcada entre los ojos de un mismo paciente. La edad de inicio y la progresión de la enfermedad varían entre los pacientes con BCD, incluso dentro de la misma familia. La mayoría de los pacientes desarrollan ceguera nocturna, 35 campo visual restringido, mala visión del color, degeneración macular y disminución de la agudeza visual entre la 2.ª y 4.ª década de la vida, y progresión a ceguera legal entre la 3.ª y 6.ª década de la vida.

Ubicado entre los vasos de la coriocapilar y los segmentos externos sensibles a la luz de los fotorreceptores, el RPE es una monocapa de células pigmentadas que interactúa estrechamente con los fotorreceptores (conos y bastones) en el mantenimiento de la función visual. Una función clave del RPE es nutrir y eliminar los productos de desecho de los fotorreceptores, que es la retina neurosensorial. Otras funciones del RPE incluyen, sin limitación: absorción de luz, transporte epitelial, amortiguación espacial de iones, ciclo visual, fagocitosis, secreción y modulación inmunitaria (Strauss, 2005, *The retinal pigment epithelium in visual function. Physiol Rev* 85:845-81). Por lo tanto, la disfunción y degeneración del RPE provocan disfunción y degeneración de los fotorreceptores, dando como resultado la pérdida de la visión. Dado que la BCD se asocia a distrofia progresiva y degeneración del RPE, el RPE es fundamental tanto para estudiar como para tratar la BCD. 45

La BCD es una enfermedad rara. Una fuente estimó que la tasa de incidencia de BCD era de 1:67.000 (ghr.nlm.nih.gov/condition/biotti-crystalline-dystrophy#statistics en la World Wide Web). Otra fuente estimó que la prevalencia de la BCD es del 2,5 % de todos los pacientes con RP (3 pacientes con índice BCD de 121 pacientes con índice RP, véase Mataftsi *et al.*, *Retina*. 24:416-426, 2004). Basándose en esta estimación y dada la tasa de incidencia de RP, se estima que es de 1:4000 (Hartong *et al.*, *Lancet*. 368:1795-1809, 2006). La tasa de incidencia de BCD se estima en 1:160.000. Debido a que los síntomas de la BCD son similares a los de otros trastornos oculares que dañan progresivamente la retina, en ocasiones se diagnostica generalmente como retinitis pigmentosa (RP) (Mataftsi A *et al.* *Biotti's crystalline comeoretinal dystrophy: a cross-sectional study. Retina*. 2004; 24: 416-426). Aunque se ha informado de pacientes con BCD en diferentes regiones del mundo, incluyendo Asia, África, Europa, el Medio Oriente, Norteamérica y Suramérica, se ha informado que la BCD es más común en personas con ascendencia de Asia oriental, especialmente en poblaciones chinas y japonesas (Hu 1983, *Ophthalmic genetics in China. Ophthal Paed Genet* 2:39-45; Li *et al.*, *Am J Hum Genet*. Mayo de 2004; 74(5): 817-826). 60

Actualmente no existe ningún tratamiento aprobado para la BCD y los pacientes eventualmente quedan ciegos. Existe una gran necesidad médica insatisfecha de desarrollar opciones de tratamiento que cambien la vida de los pacientes que padecen esta enfermedad rara. 65

CYP4V2

El CYP4V2 (citocromo P450, Familia 4, Subfamilia V, Polipéptido 2, (OMIM 608614), sinónimo: CYP4AH1) es una de las proteínas en la superfamilia del citocromo P450 y miembro de la subfamilia 4 del citocromo P450 hemotiolato (CYP4). Los citocromos P450 (CYP) son proteínas importantes que contienen hemo, conocidas por su reacción monooxigenasa. Están implicados en el metabolismo de xenobióticos y compuestos endógenos, tales como lípidos y ácidos grasos. Los CYP humanos son principalmente proteínas asociadas a membrana ubicadas en la membrana interna de las mitocondrias o en el retículo endoplásmico de las células. Las proteínas P450 pueden identificarse por su elemento de secuencia característico FxxGxxxCxG (SEQ ID NO: 30), donde la cisteína subrayada sirve como ligando axial para el hierro hemo. Otro elemento de secuencia característico para las proteínas P450 es ExxR (SEQ ID NO: 31). El Proyecto Genoma Humano ha fijado el número de genes P450 humanos en 57. Como referencia, existen 103 genes P450 de ratón y 89 genes P450 de rata. (Guengerich y Cheng, *Pharmacological Reviews*, Septiembre de 2011, 63 (3) 684-699).

La familia de CYP4 humanos consiste en 12 genes y 10 pseudogenes. El gen CYP4V2 humano (HGNC: 23198) se ubica en 4q35 y tiene 11 exones. Las mutaciones en el gen CYP4V2 provocan BCD (Li *et al.*, *Am J Hum Genet.* 74:817-826, 2004). Aunque CYP4V2 se expresa en casi todos los tejidos, se expresa a niveles elevados en la retina y el RPE y a niveles algo más bajos en la córnea, tejidos que muestran los principales hallazgos clínicos de BCD (Li *et al.*, *Am J Hum Genet.* 74:817-826, 2004; Nakano M, Kelly EJ, Rettie AE: *Expression and Characterization of CYP4V2 as a Fatty Acid omega-Hydroxylase. Drug Metab Dispos* 2009; Nakano M, Kelly EJ, Wiek C, Hanenberg H, Rettie AE: *CYP4V2 in Bietti's crystalline dystrophy: ocular localization, metabolism of omega-3-polyunsaturated fatty acids, and functional deficit of the p.H331P variant. Mol Pharmacol* 2012; 82: 679-686).

Puesto que CYP4V2 es un miembro relativamente nuevo de la familia P450 y BCD es una enfermedad rara, la función de CYP4V2 no se ha estudiado exhaustivamente. Estudios anteriores demostraron que la proteína CYP4V2 es predominantemente activa en el metabolismo de los ácidos grasos. Se han demostrado anomalías en los ácidos grasos y su metabolismo en suero, linfocitos y fibroblastos de la piel de pacientes con BCD (Lee J, Jiao X, Hejtmancik JF *et al.*: *The metabolism of fatty acids in human Bietti crystalline dystrophy. Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1707-1714; Lai T, Chu KO, Chan KP *et al.*: *Alterations in serum fatty acid concentrations and desaturase activities in Bietti crystalline dystrophy unaffected by CYP4V2 genotypes. Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 1092-1097). Otro estudio demostró que CYP4V2 es una hidroxilasa de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) omega-3 y un P450 altamente expresado en la estirpe celular humana transformada del RPE ARPE-19 (Nakano M, Kelly EJ, Wiek C, Hanenberg H, Rettie AE: *CYP4V2 in Bietti's crystalline dystrophy: ocular localization, metabolism of omega-3-polyunsaturated fatty acids, and functional deficit of the p.H331P variant. Molecular pharmacology* 2012; 82: 679-686).

Se han identificado numerosas mutaciones en el gen CYP4V2 que provocan BCD, con al menos una mutación en cada uno de los 11 exones del gen. La mutación de CYP4V2 más común entre los pacientes con BCD es c.802-8_810del17insGC (que se refiere a una delección de 17 bases con dos bases (GC) insertadas en el lugar que comienza a 8 bases del final del intrón 6 del gen CYP4V2, también conocida como IVS6-8 del/insGC, Véase la SEQ ID NO: 46 que muestra la secuencia de la región de ADN genómico de CYP4V2 humano que comprende la mutación c.802-8_810del17insGC y la SEQ ID NO: 47 que muestra la secuencia de tipo silvestre correspondiente. La mutación c.802-8_810del17insGC se ilustra en la siguiente secuencia que muestra la unión intrón 6-exón 7 del CYP4V2 humano. La secuencia del intrón 6 se muestra en minúsculas y la secuencia del exón 7 en mayúsculas. La delección de 17 pb y la inserción de GC están entre paréntesis): caa aca gaa gca tgt gat tat cat tca aa (tca tac agG TCA TCG CT) (GC) GAA CGG GCC AAT GAA ATG AAC GCC AAT GA (SEQ ID NO:46)) dando como resultado la omisión del exón 7. (Xiao *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 409:181-6, 2011; Meng *et al.*, 2014, *Mol. Vis.*, 20:1806-14; Wada *et al.*, *Am J Ophthalmol.* 139:894-9, 2005; Jiao *et al.*, *European Journal of Human Genetics* (2017) 25, 461-471). Un estudio reciente estimó que la edad de la mutación c.802-8_810del17insGC sería de 1.040-8.200 generaciones en la población china y de 300-1.100 generaciones en la población japonesa. Véase Jiao *et al.*, *European Journal of Human Genetics* (2017) 25, 461-471.

Se descubrieron diversos tipos de mutaciones de CYP4V2 asociadas a la BCD, incluyendo, pero sin limitación, sentido erróneo, duplicado, sitio de corte y empalme, desplazamiento de marco, delección, inserción, indel, sin sentido, polimorfismos (por ejemplo, polimorfismos de nucleótido único) y terminación prematura, así como la delección completa del gen CYP4V2. En la Tabla 1 del presente documento se proporciona un resumen de mutaciones de CYP4V2 selectas entre pacientes humanos con BCD y se puede encontrar en diversas publicaciones y bases de datos en línea, por ejemplo, LOVD (databases.lovd.nl/shared/genes/CYP4V2 en la World Wide Web), OMIM (omim.org/allelicVariant/608614 en la World Wide Web) y ClinVar (ncbi.nlm.nih.gov/clinvar?term=608614[MIM] en la World Wide Web).

Tabla 1: Mutaciones de CYP4V2 selectas entre pacientes con BCD

Exón	Cambio de nucleótidos	Cambio de proteína previsto
1	c.31C >T	p.Q11X
1	c.64C >G	p.L22V
1	c.71T >C	p.L24P

Exón	Cambio de nucleótidos	Cambio de proteína previsto
1	c.77G >A	p.G26D
1	c.130T>A	p.W44R
1	c.134A>C	p.Q45P
1	c.181G>A	p.G61S
1	c.197T>G	p.M66R
IVS1	c.214+1G>A	Exon1del
IVS1	c.214+25delT	No disponible
IVS1	c.215-2A>G	Exon2del

(continuación)

Exón	Cambio de nucleótidos	Cambio de proteína previsto
IVS1	c. 215 -1 G>A	Exon2del
2	c.219T>A	p.F73L
2	c.237G>T	p.E79D
2	c.253C>T	p.R85C
2	c.277T>C	p.W93R
2	c.283G>A	p.G95R
2	c.327G>A	No disponible
IVS2	c.327+1G>A	p.E72Gfs*5
IVS2	c.327+11G > C	No disponible
3	c.332T>C	p.I111T
3	c.335T>G	p.L112*
3	c.367A>G	p.M123V
3	c.400G>T	p.G134*
3	c.413+2T>G	Aceptor de corte y empalme
4	c.518T>G	p.L173W
5	c.637_641delAGTAA	p.S213*
5	c.655T>C	p.Y219H
6	c.677T>A	p.M226K
6	c.694C>T	p.R232*
6	c.724delG	p.D242Ifs*35
6	c.732G>A	p.W244*
6	c.761A>G	p.H254R
6	c.772C>T	p.L258F
6	c.791delT	Delección
7	c.802-8_806del13	Exon7del
7	c.802-8_810del17insGC	Exon7del
7	c.810delT	p.(Glu271Argfs*34)
7	c.838G>T	p.E280*
7	c.958C>T	p.R320*
7	c.971A>T	p.D324V
7	c.974C>T	p.T325I
IVS7	c.985+3A>G	No disponible
8	c.992A>C	p.H331P
8	c.998C >A	p.T333K
8	c.1020G>A	p.W340*
8	c.1021T>C	p.S341P
8	c.1027 T>G	p.Y343D
8	c.1062dupA	p.V355Sfs*4
IVS8	c.1091-2A>G	Exon9del
9	c.1157A>C	p.K386T
9	c.1168C>T	p.R390C
9	c.1169G>A	p.R390H
9	c.1178C>T	p.P393L
9	c.1187C>T	p.P396L
9	c.1198C>T	p.R400C
9	c.1199G>A	p.R400H
9	c.1219G>T	p.E407*
9	c.1225+1 G>A	p.(G364_V408del)
10	c.1226-6_1235del16	Exon10del
10	c.1328G>A	p.R443Q
10	c.1348C>T	p.Q450*

(continuación)

Exón	Cambio de nucleótidos	Cambio de proteína previsto
10	c.1355G>A	p.R452H
10	c.1372G>A	p.V458M
10	c.1393A>G	p.R465G
10	c.1396 A >G	p.N466D
10	c.1399T>C	p.C467R
10	c.1441 delT	p.(Ser481Argfs*4)
10	c.1445C>T	p.S482*
11	c.1523G>A	p.R508H
11	c.1526C>T	p.P509L
	c.604G>A	p.(Glu202Lys)
	c.242C>G	p.(Thr81Arg)
	c.604+4A>G	p.(?)
	c.1249dup	p.(Thr417Asnfs*2)
Deleción completa de CYP4V2		*

Esta es solo una lista selecta y es posible que no contenga todas las mutaciones/variantes patológicas de CYP4V2 entre los pacientes con BCD identificados y notificados hasta la fecha. Las mutaciones son con respecto a las secuencias de referencia (NM_207352.3) y (NP_997235.3). Continuamente se identifican nuevas mutaciones patológicas de CYP4V2 entre pacientes con BCD. Todas las mutaciones/variantes patológicas de CYP4V2 identificadas e identificadas en el futuro asociadas a BCD se incorporan en el presente documento por referencia.

Degeneraciones retinianas hereditarias (IRD)

Las degeneraciones retinianas hereditarias (IRD, por sus siglas en inglés) son una de las principales causas de ceguera. Actualmente se sabe que hay más de 200 genes implicados en las IRD y trastornos relacionados. La retinitis pigmentosa (RP) es la principal forma de IRD en seres humanos. Existen tres modos generales de herencia para la RP (autosómica dominante, recesiva autosómica y ligada a X). Se estimó que la tasa de incidencia mundial de la RP era de uno en 4.000, representando la RP autosómica recesiva el 50 %-60 % de la RP (Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. *Retinitis pigmentosa*. *Lancet*. 2006;368:1795-809). Un estudio realizado en Europa ha estimado que la prevalencia de la BCD es del 2,5 % de todos los pacientes con RP y aproximadamente del 10 % de las personas con RP autosómica recesiva no sindrómica (Mataftsi A, Zografos L, Millá E, Secrétan M, Munier FL. *Bietti's crystalline comeoretinal dystrophy: a cross-sectional study*. *Retina*. 2004;24:416-26). El mismo estudio también señaló que la BCD con frecuencia se diagnostica generalmente como RP. Por lo tanto, es posible que la BCD se haya subdiagnosticado. La BCD es una enfermedad mundial, pero es más común en el este de Asia, especialmente en las poblaciones china y japonesa (Li *et al.*, *Am J Hum Genet*. Mayo de 2004; 74(5): 817-826).

Referencias para las mutaciones de la Tabla 1:

- Li A, Jiao X, Munier FL, Schorderet DF, Yao W, *et al.* (2004) *Bietti crystalline comeoretinal dystrophy is caused by mutations in the novel gene CYP4V2*. *Am J Hum Genet* 74: 817-826.
- Xiao X, Mai G, Li S, Guo X, Zhang Q (2011) *Identification of CYP4V2 mutation in 21 families and overview of mutation spectrum in Bietti crystalline comeoretinal dystrophy*. *Biochem Biophys Res Commun* 409: 181-186.
- Shan M, Dong B, Zhao X, Wang J, Li G, *et al.* (2005) *Novel mutations in the CYP4V2 gene associated with Bietti crystalline comeoretinal dystrophy*. *Mol Vis* 11: 738-743.
- Rossi S, Testa F, Li A, Yaylacioglu F, Gesualdo C, *et al.* (2013) *Clinical and genetic features in Italian Bietti crystalline dystrophy patients*. *Br J Ophthalmol* 97: 174-179.
- Lin J, Nishiguchi KM, Nakamura M, Dryja TP, Berson EL, *et al.* (2005) *Recessive mutations in the CYP4V2 gene in East Asian and Middle Eastern patients with Bietti crystalline comeoretinal dystrophy*. *J Med Genet* 42: e38.
- Manzouri B, Sergouniotis PI, Robson AG, Webster AR, Moore A (2012) *Bietti crystalline retinopathy: report of retinal crystal deposition in male adolescent siblings*. *ARCH OPHTHALMOL* 130: 1470-1473.
- Lai TY, Ng TK, Tam PO, Yam GH, Ngai JW, *et al.* (2007) *Genotype phenotype analysis of Bietti's crystalline dystrophy in patients with CYP4V2 mutations*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 5212-5220.
- Parravano M, Sciamanna M, Giomo P, Boninfante A, Varano M (2012) *Bietti crystalline dystrophy: a morpho-functional evaluation*. *Doc Ophthalmol* 124: 73-77.
- Wada Y, Itabashi T, Sato H, Kawamura M, Tada A, *et al.* (2005) *Screening for mutations in CYP4V2 gene in Japanese patients with Bietti's crystalline comeoretinal dystrophy*. *Am J Ophthalmol* 139: 894-899.
- Zenteno JC, Ayala-Ramirez R, Graue-Wiechers F (2008) *Novel CYP4V2 gene mutation in a Mexican patient with Bietti's crystalline comeoretinal dystrophy*. *Curr Eye Res* 33: 313-318.
- Lee KY, Koh AH, Aung T, Yong VH, Yeung K, *et al.* (2005) *Characterization of Bietti crystalline dystrophy patients with CYP4V2 mutations*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 3812-3816.
- Yokoi Y, Sato K, Aoyagi H, Takahashi Y, Yamagami M, *et al.* (2011) *A Novel Compound Heterozygous Mutation in the CYP4V2 Gene in a Japanese Patient with Bietti's Crystalline Comeoretinal Dystrophy*. *Case Rep*

Ophthalmol 2: 296-301.

Haddad NM, Waked N, Bejjani R, Khoueir Z, Chouery E, *et al.* (2012) *Clinical and molecular findings in three Lebanese families with Bietti crystalline dystrophy: report on a novel mutation.* *Mol Vis* 18: 1182-1188.

Fu Q, Wang F, Wang H, Xu F, Zaneveld JE, *et al.* (2013) *Next-generation sequencing-based molecular diagnosis of a Chinese patient cohort with autosomal recessive retinitis pigmentosa.* *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54: 4158-4166.

Song Y, Mo G, Yin G (2013) *A novel mutation in the CYP4V2 gene in a Chinese patient with Bietti's crystalline dystrophy.* *Int Ophthalmol* 33: 269-276.

Jin ZB, Ito S, Saito Y, Inoue Y, Yanagi Y, *et al.* (2006) *Clinical and molecular findings in three Japanese patients with crystalline retinopathy.* *Jpn J Ophthalmol* 50: 426-431.

Halford S, Liew G, Mackay DS, Sergouniotis PI, Holt R, Broadgate S, Volpi EV, Ocaka L, Robson AG, Holder GE, Moore AT, Michaelides M, Webster AR. *Detailed phenotypic and genotypic characterization of bietti crystalline dystrophy.* *Ophthalmology.* 2014; 121:1174-84

Houfa Yin, Chongfei Jin, Xiaoyun Fang, Qi Miao, Yingying Zhao, Zhiqing Chen, Zhaoan Su, Panpan Ye, Yao Wang y Jinfu Yin, *Molecular Analysis and Phenotypic Study in 14 Chinese Families With Bietti Crystalline Dystrophy.* *PLoS One* 9 (4), e94960. 16 de abril de 2014.

Xiao Hong Meng, Hong Guo, Hai Wei Xu, Qi You Li, Xin Jin, Yun Bai, Shi Ying Li, Zheng Qin Yin, *Identification of novel CYP4V2 gene mutations in 92 Chinese families with Bietti's crystalline comeoretinal dystrophy,* *Molecular Vision* (2014); 20:1806-1814

Galuh D N Astuti, Vincent Sun, Miriam Bauwens, Ditta Zobor, Bart P Leroy, Amer Omar, Bernhard Jurklics, Irma Lopez, Huanan Ren, Volkan Yazar, Christian Hamel, Ulrich Kellner, Bernd Wissinger, Susanne Kohl, Elfride De Baere, Rob W J Collin y Robert K Koenekoop, *Novel insights into the molecular pathogenesis of CYP4V2-associated Bietti's retinal dystrophy,* *Mol Genet Genomic Med.* Enero de 2015; 3(1): 14-29.

Xiaodong Jiao, Anren Li, Zi-Bing Jin, Xinjing Wang, Alessandro Iannaccone, Elias I Traboulsi, Michael B Gorin, Francesca Simonelli y J Fielding Hejtmancik, *Identification and Population History of CYP4V2 mutations in Patients with Bietti Crystalline Comeoretinal Dystrophy,* *European Journal of Human Genetics* (2017) 25, 461-471.

El documento CN 104 745 592 A describe un mutante del gen CYP4V2 y aplicaciones del mismo, por ejemplo, en un método para cribar una muestra biológica susceptible a la degeneración retiniana primaria similar a cristales.

El documento CN 104 745 594 A describe un mutante del gen CYP4V2 adicional y aplicaciones del mismo, por ejemplo, en un método para cribar una muestra biológica susceptible a la degeneración retiniana primaria similar a cristales.

El documento CN 104 745 591 A describe un mutante del gen CYP4V2 adicional y aplicaciones del mismo, por ejemplo, en un método para cribar una muestra biológica susceptible a la degeneración retiniana primaria similar a cristales.

El documento CN 103 374 574 A describe un mutante del gen CYP4V2 adicional y un método para cribar medicamentos para tratar o prevenir la distrofia del cristalino de Bietti (BCD).

El documento CN 103 468 820 B describe un kit para detectar mutaciones en un gen CYP4V2 implicado en la BCD.

Lai TYY *et al.* describen en *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 48, n.º 11, 30 de noviembre de 2007, en las páginas 5212-5220 un análisis de genotipo-fenotipo de la distrofia del cristalino de Bietti en pacientes con mutaciones de CYP4V2.

Park *et al.* describen bajo la secuencia de referencia NCBI NM_207352.3, el 21 de mayo de 2017, un ARNm de CYP4V2 de *Homo sapiens*.

Bajo la secuencia de referencia NCBI XM_011959515.1, publicada el 30 de marzo de 2015, se describe un ARNm de CYP4V2(LOC105524323) de *Colobus angolensis palliatus*.

Tashiro *et al.* describen en el n.º de acceso de Genbank BAC85487.I, publicado el 9 de enero de 2008, un "producto proteico sin nombre" relacionado con CYP4V2.

El documento CN 103 374 575 A describe un mutante del gen CYP4V2 adicional y un método para cribar medicamentos para tratar o prevenir la distrofia del cristalino de Bietti (BCD).

El documento US 2016/0244837 A1 describe polimorfismos genéticos, incluyendo polimorfismos en los genes CYP4V2, asociados a trombosis venosa y respuesta a estatinas.

SUMARIO

La presente invención se define por la reivindicación independiente 1. Las reivindicaciones dependientes representan realizaciones adicionales de la invención.

En un aspecto, se proporciona un vector que incluye una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia que codifica una proteína CYP4V2 no mutante o funcional o una variante funcional de la misma que tiene al menos un 96 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 4-6 y 19-29 unida operativamente a una secuencia reguladora. El vector es un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV).

En algunas realizaciones, el vector de rAAV incluye una proteína de la cápside VP1, VP2 o VP3 seleccionada de cualquier serotipo de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, u

otro serotipo o aislado o clado derivado de forma natural de AAV, o híbridos, variantes o derivados de los mismos. En algunas realizaciones, el vector de rAAV incluye una repetición terminal invertida (ITR, por sus siglas en inglés) de AAV 5' o una ITR de AAV 3' seleccionada de una cualquiera de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, u otro serotipo o aislado o clado derivado de forma natural de AAV, o mutaciones, quimeras, variantes o fusiones de los mismos.

En algunas realizaciones, el vector de rAAV es un AAV quimérico, un AAV reordenado o un AAV con cápside modificada. En algunas realizaciones, el vector de rAAV es un AAV pseudotipado. En algunas realizaciones, el vector de rAAV es un AAV híbrido.

En algunas realizaciones, el vector de rAAV incluye una o más mutaciones en una o más proteínas de la cápside de AAV derivadas de forma natural. En algunas realizaciones, las mutaciones en la proteína de la cápside de AAV incluyen uno o más sustituciones de restos de aminoácidos Y-F, K-R, T-A, S-A o T-V.

En algunas realizaciones, el vector de rAAV se selecciona del grupo que consiste en AAV2/5, AAV2/8, AAV2/2, AAV2 (Y444F+Y500F+Y730F), AAV2/1, AAV2/9, AAV2/8(Y733F), AAV2/6, AAV2/4, AAV2/7, AAV5, AAV2, AAV8, AAV1, AAV9, AAV6, AAV10, AAV3, AAV4, AAV7, AAV11, AAV12, Anc80, AAV 7m8, AAV-DJ, ShH10, AAV-PHP.B, rh10 y un híbrido, un derivado o variante de los mismos. En algunas realizaciones, el vector de rAAV es un vector de AAV monocatenario o un vector de AAV autocomplementario (scAAV).

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico tiene al menos un 76 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1 - 3.

En algunas realizaciones, la secuencia reguladora incluye un promotor. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor específico de células del epitelio pigmentario retiniano (RPE), un promotor específico de fotorreceptores, un promotor específico de células retinianas, un promotor específico de células corneales, un promotor específico de células oculares, un promotor con especificidad celular, un promotor histoespecífico, un promotor constitutivo, un promotor omnipresente, un promotor regulado, un promotor inducible o un derivado o híbrido de los mismos. En algunas realizaciones, el promotor se selecciona del grupo que consiste en un promotor CAG (también conocido como promotor CAGGS, promotor CB o promotor CBA), un promotor de beta actina de pollo, un promotor CBA pequeño (smCBA), un promotor CBSB, un promotor CBh, un promotor de beta-actina, un promotor de beta actina humana, un promotor del factor de elongación 1 alfa corto (EFS), un promotor del factor de elongación 1 alfa (EF-1 alfa o EF-1 α), un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor PGK, un promotor UBC, un promotor GUSB, un promotor UCOE, un promotor VMD2 (distrofia macular viteliforme 2; también conocido como BEST1), un promotor RPE65, un promotor GRK1, un promotor proximal de la proteína de unión a retinoides interfotorreceptores (IRBP) humano, un fragmento de 235 nt del promotor hIRBP, un promotor proximal RGR, el promotor de opsina de color rojo, un promotor de opsina de color rojo-verde, el promotor de opsina de color azul, el promotor de opsina de ratón, un promotor de rodopsina (Rho), un promotor de beta fosfodiesterasa (PDE), un promotor de retinitis pigmentosa (RP1), el promotor NXNL2/NXNL1, un promotor de degeneración retiniana lenta/periferina 2 (Rds/perphZ), un promotor IRBP/GNAT2 (potenciador hIRBP fusionado con el promotor de transducina alfa de cono), un promotor Rds (degeneración retiniana lenta), un promotor hPDE6b, un promotor VEcad (promotor VE-cadherina/Cadherina 5 (CDH5)/CD144), un promotor sensible al calcio, un promotor NFAT, un promotor de metaliohionina (MX) de oveja inducible por cinc, un promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), un sistema promotor de la polimerasa T7, un promotor de insectos de ecdisona, un sistema reprimible por tetraciclina, un sistema inducible por tetraciclina, un sistema inducible por RU486 y un sistema inducible por rapamicina, un híbrido, una variante y un derivado de los mismos.

En algunas realizaciones, la secuencia reguladora incluye una secuencia Kozak. En algunas realizaciones, la secuencia reguladora incluye un potenciador. En algunas realizaciones, el potenciador incluye un elemento regulador postranscripcional (PRE), un sitio interno de entrada a ribosomas (IRES), una secuencia reguladora de intrones, un donante/aceptor de corte y empalme de mini-intrones (SD-SA) o un elemento de transporte constitutivo (CTE). En algunas realizaciones, el potenciador se selecciona del grupo que consiste en un potenciador del elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE), un potenciador del elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis B (HPRE o HBVPRE), un potenciador IRBP, un potenciador CTE del virus del mono Mason-Pfizer, un potenciador CTE del virus de la leucemia aviar, un potenciador temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) y un potenciador de SV40.

En algunas realizaciones, la secuencia reguladora incluye una señal de poliadenilación (poliA). En algunas realizaciones, la señal de poliA se selecciona del grupo que consiste en una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (poli A de bGH), una señal de poliA pequeña (SPA), una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento humano (poliA de hGH), una señal de poliA de SV40, una señal de poliA temprana de SV40, una señal de poliA tardía de SV40, un derivado y un híbrido de los mismos.

En algunas realizaciones, la secuencia reguladora incluye un potenciador en dirección 5' (USE) unido operativamente a una señal de poliA. En algunas realizaciones, el USE se selecciona del grupo que consiste en 2xUSE tardío de SV40, USE del VIH-1 (virus de inmunodeficiencia humana 1), USE del GHV (virus de la hepatitis

de la ardilla terrestre), USE de Adenovirus (L3), USE de hTHGB (protrombina humana) y USE de hC2 (gen del complemento C2 humano).

En algunas realizaciones, la secuencia reguladora incluye una secuencia de intrón, una secuencia UTR, una secuencia del sitio de corte y empalme, una secuencia de dominio regulador en dirección 5', una secuencia de elemento de respuesta, una secuencia de elemento inducible, un origen de secuencia de replicación, una secuencia de sitio interno de entrada a ribosomas (IRES), una secuencia de inicio de la transcripción, una secuencia de terminación, una secuencia de procesamiento de ARN, una secuencia de unión o una secuencia enlazadora. En algunas realizaciones, la secuencia reguladora es heteróloga u homóloga con respecto a la secuencia codificante de CYP4V2 cuya expresión regula dicha secuencia reguladora. En algunas realizaciones, la secuencia reguladora incluye una secuencia diana de microARN (miARN) histoespecífica o con especificidad celular.

En algunas realizaciones, cualquier parte del vector comparte al menos un 43 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias del casete de expresión de CYP4V2 en las SEQ ID NO: 60 a 64 o al menos un 43 % de identidad de secuencia con cualquiera de las siguientes secuencias: nucleótido (nt) 237 - nt 3579 de la SEQ ID NO 60; nt 166 - nt 3515 de la SEQ ID NO 61; nt 166 - nt 3515 de la SEQ ID NO 62; nt 166 - nt 3515 de la SEQ ID NO 63; o nt 130 - nt 2097 de la SEQ ID NO 64.

En algunas realizaciones, el vector se formula con un portador y componentes adicionales adecuados para la vía de administración específica.

En otro aspecto, se proporciona una célula hospedadora que incluye un vector descrito anteriormente. En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero o una célula de insecto. En algunas realizaciones, la célula es una célula HEK293. En algunas realizaciones, la célula es una célula epitelial pigmentaria retiniana (RPE, por sus siglas en inglés), una célula fotorreceptora, una célula progenitora de fotorreceptores, una célula coroidea, una célula retiniana, una célula madre pluripotente inducida (iPS, por sus siglas en inglés), o una célula madre, de o derivada de un sujeto humano que padece distrofia del cristalino de Bietti (BCD, también conocida como distrofia comeorretiniana del cristalino de Bietti, retinopatía del cristalino de Bietti, distrofia retiniana de Bietti) o retinitis pigmentosa (RP) o degeneración retiniana hereditaria (IRD) con mutaciones de CYP4V2.

En otro aspecto, una célula descrita anteriormente es para su uso en un método de tratamiento, detención o prevención de la distrofia del cristalino de Bietti (BCD, también conocida como distrofia comeorretiniana del cristalino de Bietti, retinopatía del cristalino de Bietti, distrofia retiniana de Bietti), o retinitis pigmentosa (RP) o degeneración retiniana hereditaria (IRD) con mutaciones de CYP4V2 en un sujeto humano que lo necesite. El método incluye suministrar, al ojo del sujeto humano, una cantidad terapéuticamente eficaz de la célula.

En otro aspecto, un vector descrito anteriormente es para su uso en un método de prevención, detención o ralentización de la progresión, o mejoría de la disfunción, distrofia, trastorno, degeneración y/o muerte de una célula ocular de un sujeto humano que tiene distrofia del cristalino de Bietti (BCD, también conocida como distrofia comeorretiniana del cristalino de Bietti, retinopatía del cristalino de Bietti, distrofia retiniana de Bietti) o retinitis pigmentosa (RP) o degeneración retiniana hereditaria (IRD) con mutaciones de CYP4V2. El método incluye suministrar a la célula ocular una cantidad terapéuticamente eficaz del vector. En algunas realizaciones, la célula ocular es una célula retiniana, una célula epitelial pigmentaria retiniana (RPE), una célula fotorreceptora (bastón o cono), una célula epitelial coroidea, una célula del epitelio corneal, una célula coroidea, una célula corneal, una célula bipolar de la retina, una célula progenitora de fotorreceptores, una célula ganglionar o una célula del nervio óptico.

En otro aspecto, un vector descrito anteriormente es para su uso en un método de tratamiento, detención o prevención de la distrofia del cristalino de Bietti (también conocida como distrofia comeorretiniana del cristalino de Bietti; retinopatía del cristalino de Bietti; distrofia retiniana de Bietti; BCD) o degeneración retiniana hereditaria (IRD) o retinitis pigmentosa (RP) o distrofia corneal) provocada por mutaciones en el gen CYP4V2 en un sujeto humano que lo necesite. El método incluye suministrar a una o más células oculares del sujeto humano una cantidad terapéuticamente eficaz del vector. La una o más células oculares se seleccionan de células epiteliales pigmentarias retinianas (RPE), una o más células coroideas y una o más células fotorreceptoras del sujeto humano.

En otro aspecto, un vector descrito anteriormente es para su uso en un método de tratamiento, detención o prevención de una enfermedad del sujeto humano que se asocia a la atrofia, distrofia, disfunción, degeneración o muerte de una célula ocular. El método incluye suministrar a la célula ocular del sujeto humano una cantidad terapéuticamente eficaz del vector. La célula ocular es una célula RPE.

En otro aspecto, un vector descrito anteriormente es para su uso en un método de tratamiento, detención o prevención de una enfermedad del sujeto humano que se asocia a la atrofia, distrofia, disfunción, degeneración o muerte de una célula ocular. El método incluye suministrar, al ojo del sujeto humano, una cantidad terapéuticamente eficaz de una célula RPE, célula progenitora fotorreceptora o célula madre, donde la célula RPE, célula progenitora fotorreceptora o célula madre incluye el vector.

Otras características y ventajas de las invenciones resultarán evidentes a partir de la Descripción detallada, la Descripción de los dibujos y los Ejemplos, así como de las reivindicaciones.

5 DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las invenciones se ilustran con más detalle en las siguientes figuras y dibujos, que no limitan el alcance de las invenciones descritas en las reivindicaciones.

10 *Patente de estirpe celular:*

Figura 1: Estirpes celulares iPS derivadas de pacientes con BCD

- 15 (a) células iPS generadas a partir de fibroblastos de muestras de biopsia de piel de pacientes con BCD:
- (i) células iPS del Paciente 1 (P1)
 - (ii) células iPS del Paciente 2 (P2)
 - (iii) caracterización de las estirpes celulares iPS P1 y P2 por Oct-4, marcadores Sox-2 y SSEA-4
 - (iv) caracterización de estirpes celulares iPS P1 y P2 mediante marcadores Nanog y Tra-1-60
- 20 (b) células iPS generadas a partir de un paciente con BCD y un control sano a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de sangre:
- (i) imágenes de contraste de fase de estirpes celulares iPS
 - (ii) resultados de la tinción AP de estirpes celulares iPS
- 25 (c) imágenes de cariotipo de células iPS derivadas de pacientes con BCD que muestran un cariotipo humano aparentemente normal.

30 Figura 2: Estirpes celulares iPS-RPE derivadas de pacientes con BCD:

- (a) imágenes de campo claro de estirpes celulares iPS-RPE derivadas de pacientes con BCD que muestran una morfología única del RPE: forma hexagonal, pigmentación y monocapa:
- (i) células iPS-RPE P1
 - (ii) células iPS-RPE P2
- 35 (b) resultados de marcadores de RPE de células iPS-RPE de pacientes con BCD, que muestran la presencia de marcadores específicos de RPE, RPE65, CRALBP y MITF.

40 Figura 3: Resultados de qRT-PCR de la expresión de CYP4V2 en muestras de iPS-RPE. TS (controles). PROM DE TS (promedio de controles). P1 (Paciente 1 con BCD). P1-AAV8 (muestra de P1 tratada con AAV8.CYP4V2fv, MOI = 1,5 x 10⁴ GC/célula).

45 Figura 4: Resultados de qRT-PCR de la expresión de CYP4V2op en muestras de iPS-RPE. TS (controles). PROM DE TS (promedio de controles). P1 y P2 (Paciente 1 y Paciente 2 con BCD). P1-AAV2 (muestra de P1 tratada con AAV2.CYP4V2op a una MOI de 2x10⁴ GC/célula). P2-AAV2 (muestra de P2 tratada con AAV2.CYP4V2op a una MOI de 2x10⁴ GC/célula). P2-scAAV1 (muestra de P2 tratada con scAAV1.CYP4V2op a una MOI de 2x10⁴ GC/célula).

50 Figura 5: Imágenes de viabilidad celular de muestras de iPS-RPE sin exposición a luz azul. TS (controles). P1 y P2 (Paciente 1 y Paciente 2 con BCD). Rojo (células muertas/enfermas); Verde (células vivas/sanas). Figura 5(a): solo rojo. Figura 5(b): rojo y verde.

55 Figura 6: Imágenes de viabilidad celular de muestras de iPS-RPE después de 1 hora de exposición a luz azul. TS (controles). P1 y P2 (Paciente 1 y Paciente 2 con BCD). Rojo (células muertas/enfermas); Verde (células vivas/sanas). Figura 6(a): solo rojo. Figura 6(b): rojo y verde.

60 *Terapia génica:*

Figura 7: Esquemas y anotaciones de casetes de expresión de CYP4V2 de ejemplo y vectores de AAV recombinantes (rAAV)

- 65 (a) Casete de expresión de CYP4V2 (con un potenciador) empaquetado en vectores de AAV monocatenarios (ssAAV)
- (b) Casete de expresión de CYP4V2 (sin potenciador) empaquetado en vectores de AAV

monocatenarios (ssAAV)

(c) Casete de expresión de CYP4V2 empaquetado en vectores de AAV autocomplementarios (scAAV) o ssAAV.

Anotaciones: Se puede empaquetar un casete de expresión de CYP4V2 (como se muestra flanqueado por ITR de AAV) en un vector de rAAV con cápside de cualquier serotipo de AAV o un híbrido o variante del mismo. ITR: Repeticiones terminales invertidas (pueden ser ITR de AAV2 o ITR de otros serotipos de AAV). Secuencias ITR de AAV2 de ejemplo mostradas en las SEQ ID NO: 42 y 43. CYP4V2: un ADNc que codifica la proteína CYP4V2 humana o una variante funcional de la misma, por ejemplo, CYP4V2st (SEQ ID NO: 1) o CYP4V2op (SEQ ID NO: 2) que codifican la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4), o CYP4V2fv (SEQ ID NO: 3) que codifica una proteína CYP4V2 funcional (SEQ ID NO: 5). Se inserta una secuencia Kozak (secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 37 o 38) inmediatamente antes de la secuencia de ADNc de CYP4V2. CAG: promotor CAG híbrido (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 32). También pueden usarse otros promotores analizados en el presente documento, incluyendo, sin limitación, un promotor CMV (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 40) o un promotor EF-1 α (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 41). WPRE: elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 33). poliA de bGH: señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 34). Pueden usarse señales de poliA alternativas, por ejemplo, una señal de poli A tardía de SV40 (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 39). EFS: promotor central del factor de elongación 1 α corto (EFS). Secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 35. SPA: una señal de poliA pequeña. Secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 36. ITR mutante/truncada: Una de las dos ITR utilizadas en un vector de scAAV es una ITR mutante/truncada (mostrada como ITR*). Secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 44. Un potenciador es opcional en los casetes de expresión de CYP4V2.

Figura 8: Imágenes de viabilidad celular de muestras de iPS-RPE obtenidas de pacientes con BCD después de 1 hora de exposición a luz azul (sin tratamiento con AAV.CYP4V2 frente a tratados con AAV2.CYP4V2op o scAAV1.CYP4V2op a una MOI de 1x10⁵ GC/célula). P1 y P2 (Paciente 1 y Paciente 2 con BCD). Rojo (células muertas/enfermas); Verde (células vivas/sanas). Figura 8(a): solo rojo. Figura 8(b): rojo y verde.

Figura 9: Imágenes de viabilidad celular de muestras de iPS-RPE obtenidas de pacientes con BCD después de 1 hora de exposición a luz azul (sin tratamiento con AAV.CYP4V2 frente a tratados con AAV5.CYP4V2op, AAV5.CYP4V2st o AAV8.CYP4V2fv a una MOI de 1x10⁵ GC/célula). P1 (Paciente 1 con BCD). Rojo (células muertas/enfermas); Verde (células vivas/sanas). Figura 9(a): solo rojo. Figura 9(b): rojo y verde.

Figura 10: Imágenes de viabilidad celular de muestras de iPS-RPE obtenidas de pacientes con BCD después de 1 hora de exposición a luz azul (sin tratamiento con AAV.CYP4V2 frente a tratados con AAV5.CYP4V2op, scAAV1.CYP4V2op o scAAV5.CYP4V2op a una MOI de 1x10⁴ GC/célula). P2 (Paciente 2 con BCD). Rojo (células muertas/enfermas); Verde (células vivas/sanas). Figura 10(a): solo rojo. Figura 10(b): rojo y verde.

Figura 11: Imágenes de viabilidad celular de muestras de iPS-RPE obtenidas de pacientes con BCD después de 1 hora de exposición a luz azul (sin tratamiento con AAV.CYP4V2 frente a tratados con scAAV9.CYP4V2op a una MOI de 1x10⁵ GC/célula). P1 (Paciente 1 con BCD). Rojo (células muertas/enfermas); Verde (células vivas/sanas). Figura 11(a): solo rojo. Figura 11(b): rojo y verde.

Terapia celular:

La Figura 12 muestra una región de la secuencia de CYP4V2 y la posición de los ARN guía (ARNg) diseñados con respecto a la mutación c.802-8_810del17insGC y los cebadores (flechas naranjas) para el ensayo de actividad de ARNg

La Figura 13 muestra un ensayo de topografía *in vitro*. Calles 1: amplicón+Cas9; 2: amplicón + g1 + Cas9; 3: amplicón + g2 + Cas9; 4: amplicón + g3 + Cas9; 5: amplicón + g4 + Cas9; 6: amplicón + g5 + Cas9; 7: amplicón solamente; M: marcador de ADN de 1 kb.

La Figura 14 es una comparación de secuencias que confirma el origen del ADN utilizado en el ensayo de topografía. Parte superior: amplicón sin tratar; Centro: fragmento de amplicón tratado con g2; Parte inferior: locus de CYP4V2 que indica el sitio de mutación.

La Figura 15 es una ilustración de la construcción del vector de ARNg.

La Figura 16 es un mapa de vector de ARNg (usando g1 como ejemplo), plásmido de coexpresión de Cas9 y PuroR pX459-hSpCas9-2A-Puro.

La Figura 17 muestra la posición del ARNg (usando g1 como ejemplo) con respecto al promotor U6 en el plásmido pX459-hSpCas9-2A-Puro. El nucleótido "G" entre el promotor U6 y el ARNg tiene como objetivo potenciar la eficiencia de la transcripción impulsada por el promotor U6. Es opcional y no necesario cuando se usa un promotor diferente o cuando el ARNg comienza con un nucleótido "G".

DEFINICIONES

Debe entenderse que como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, "un/a" o "uno/una" puede significar uno/una o más, dependiendo del contexto en el que se use. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "una

célula" puede significar "al menos una célula" o "más de una célula".

El término "aproximadamente" o la expresión "alrededor de" o el símbolo "~" se refieren a un intervalo de más o menos el 10 % (inclusive) de un valor o estado dado. A menos que sea evidente por el contexto, todos los valores numéricos proporcionados en el presente documento se pueden modificar por el término aproximadamente.

El término "AAV.CYP4V2" se refiere a un vector de virus adenoasociado (AAV) recombinante que comprende un polinucleótido que codifica una proteína CYP4V2 funcional.

La expresión "terapia génica de CYP4V2" se refiere a la introducción de una proteína CYP4V2 funcional o un polinucleótido que codifica una proteína CYP4V2 funcional en una célula y/o un sujeto. Véase el análisis detallado en la divulgación.

La expresión "cantidad eficaz" o "dosificación eficaz" o "dosificación terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto (por ejemplo, un vector) y/o células suficiente y/o adecuada para efectuar el tratamiento cuando se administra a un sujeto que necesita dicho tratamiento. La cantidad eficaz variará dependiendo de la actividad específica del agente terapéutico que se esté usando, la gravedad de la patología del paciente y la edad, el estado físico, existencia de otras patologías y el estado nutricional del sujeto. Adicionalmente, otros medicamentos y/o tratamientos que el paciente pueda estar recibiendo afectarán a la determinación de la cantidad eficaz del agente terapéutico que se ha de administrar. Véase la descripción del presente documento para consultar un análisis más detallado.

El término "tratamiento" o "tratar" se refiere a la administración de una composición como se divulga en el presente documento (por ejemplo, un AAV que comprende un transgén y/o células) a un sujeto con fines que incluyen 1) prevenir o proteger contra la enfermedad o afección, es decir, provocar que los síntomas clínicos no se desarrollen; 2) inhibir la enfermedad o afección, es decir, detener, ralentizar, mejorar o suprimir el desarrollo de síntomas clínicos; 3) aliviar la enfermedad o afección, es decir, provocar la regresión de los síntomas clínicos; y/o 4) reemplazar y/o restablecer la función perdida de las células, tejido y/u órgano enfermos. En algunas realizaciones, el término "tratamiento" o "tratar" se refiere a aliviar la enfermedad o afección; es decir, provocar la regresión de los síntomas clínicos. En algunas realizaciones, el término "tratamiento" o "tratar" alternativa o adicionalmente se refiere al tratamiento profiláctico de un sujeto que lo necesita. El tratamiento profiláctico se puede lograr proporcionando una dosis apropiada de un agente terapéutico a un sujeto en riesgo de padecer una dolencia, evitando de este modo sustancialmente la aparición de la dolencia. Los expertos en la materia entenderán que no siempre es posible distinguir entre "prevenir" y "suprimir", puesto que el evento o eventos inductivos finales pueden ser desconocidos o latentes, o puede no evaluarse al paciente hasta mucho después de que ocurra el evento o eventos. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, el término "profilaxis" pretende ser un elemento de "tratamiento" que abarca tanto "prevención" como "supresión" como se define en el presente documento.

El término "sujeto" se refiere a un animal, tal como un mamífero, por ejemplo, un ser humano. Los métodos descritos en el presente documento pueden ser útiles en aplicaciones terapéuticas humanas, preclínicas y veterinarias. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero y, en algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

Una "variante" es una proteína con homología de secuencia con la proteína biológicamente activa de referencia que retiene al menos una porción de la actividad terapéutica y/o biológica de la proteína biológicamente activa. Por ejemplo, una proteína variante puede tener al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos en comparación con la proteína biológicamente activa de referencia. La expresión "proteína biológicamente activa" incluye proteínas modificadas de manera deliberada, como por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio, inserciones o, de manera accidental, a través de mutaciones. Una "variante" incluye un "fragmento", que es una forma truncada de una proteína biológicamente activa nativa o no nativa que conserva al menos una porción de la actividad terapéutica y/o biológica.

La expresión "ácido nucleico" se usa en el presente documento para referirse a todas las formas de ácido nucleico, polinucleótidos y oligonucleótidos, incluyendo el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN). Los ácidos nucleicos incluyen ADN genómico, ADNc y ARN. Los polinucleótidos incluyen polinucleótidos de origen natural, sintéticos y modificados o alterados intencionalmente. Los polinucleótidos pueden ser simples, dobles o triples, lineales o circulares, y pueden tener cualquier longitud. En el presente documento puede describirse una secuencia o estructura de un polinucleótido particular de acuerdo con la convención normal de proporcionar la secuencia en la dirección 5' a 3'.

La expresión "variante de secuencia" significa genes o polipéptidos que han sido modificados en comparación con su secuencia nativa u original mediante una o más inserciones, delecciones y/o sustituciones de nucleótidos o aminoácidos. Las inserciones pueden ubicarse en uno o ambos extremos del gen o proteína, y/o pueden ubicarse dentro de regiones internas de la secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos. En variantes de delección, se eliminan uno o más restos de nucleótidos o aminoácidos en un gen o polipéptido como se describe en el

presente documento. En las variantes de sustitución, uno o más restos de nucleótidos o aminoácidos de un gen o polipéptido se eliminan y se reemplazan con restos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son de naturaleza conservadora y se conocen bien en la técnica sustituciones conservadoras de este tipo.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "terapia" o "tratamiento" puede aplicarse ya sea *in vivo* a un sujeto o *in vitro* en una célula.

Como se usa en el presente documento, un plásmido es un tipo de vector.

- 10 Como se usa en el presente documento, la expresión "reparado genéticamente" o "reparación genética" se refiere a una célula que originalmente alberga un defecto genético (por ejemplo, una mutación o una alteración patológica) en un gen, habiéndose reparado su defecto genético a través de corrección o alteración génica del ADN genómico o ARNm de la célula (definida en el presente documento como "edición génica", "terapia de edición génica" o "corrección génica"), o mediante transferencia génica o suplementación de una molécula de ácido nucleico
- 15 exógena a la célula que expresa una proteína funcional correspondiente al gen defectuoso (definida en el presente documento como "terapia de transferencia génica" o "terapia génica").

- Como se usa en el presente documento, la expresión "porcentaje de identidad de secuencia" o "identidad de secuencia" se determinará y calculará de la siguiente manera. A la hora de calcular el (porcentaje de) identidad de
- 20 secuencia, se alinean dos secuencias y se determina el número de coincidencias de restos de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre las dos secuencias. El número de coincidencias idénticas se divide por la longitud de la región alineada (es decir, el número de nucleótidos o restos de aminoácidos alineados) y se multiplica por 100 para llegar a un valor de porcentaje de identidad de secuencia (y se redondea al siguiente número entero superior (por ejemplo, el 65,01 % se redondeará al alza al 66 % y se considerará 66 % a los efectos del presente
- 25 documento)). Se apreciará que la longitud de la región alineada puede ser una porción de una o ambas secuencias, hasta el tamaño de la longitud neta completa (sin aplicar hueco) de la secuencia más corta. Para determinar coincidencias idénticas y calcular la identidad de secuencia entre dos secuencias de nucleótidos que codifican proteínas, cualquier secuencia de nucleótidos no codificante (por ejemplo, sin limitación, un intrón, UTR, secuencia Kozak, promotor, potenciador u otras secuencias reguladoras) se eliminará antes de enviar las dos secuencias para su alineación y calcular la identidad de la secuencia. La alineación de dos secuencias para determinar el
- 30 número de coincidencias idénticas de nucleótidos o restos de aminoácidos entre las dos secuencias puede realizarse usando Pairwise Sequence Alignment EMBOSS Needle, que crea una alineación global óptima de dos secuencias usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (disponible en el Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI) y en la World Wide Web: ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/nucleotide.html para la alineación de nucleótidos y ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/ para la alineación de proteínas) y usando parámetros predeterminados (para el uso de secuencias de nucleótidos: Matriz: EDNAFULL. Penalización por apertura de huecos: 10. Penalización por extensión de huecos: 0,5. Formato de salida: par. Penalización por hueco terminal: falso. Penalización por apertura de hueco terminal: 10. Penalización por extensión de hueco terminal: 0,5. Para el uso de secuencias de proteínas: Matriz: EBLOSUM62. Penalización por apertura de huecos: 10. Penalización por extensión de huecos: 0,5. Formato de salida: par. Penalización por hueco terminal: falso. Penalización por apertura
- 35 de hueco terminal: 10. Penalización por extensión de hueco terminal: 0,5).

- La expresión "vector de virus adenoasociado" se refiere a un ácido nucleico derivado de cualquier serotipo de AAV, por ejemplo, el serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 o
- 45 cualquier otro virus o serotipo que comparta una secuencia de proteína de la cápside homóloga a la proteína de la cápside de un serotipo de AAV. La expresión "virus adenoasociado recombinante" o "rAAV" se refiere a un virus infeccioso, con replicación defectuosa, compuesto por una cubierta de proteína de AAV que encapsula una molécula de ácido nucleico de interés, que está flanqueado en uno o ambos lados por ITR de AAV. Como se usa en el presente documento, la referencia a un serotipo de AAV particular significa un AAV que tiene al menos una
- 50 proteína de la cápside de ese serotipo de AAV. Por ejemplo, el término "AAV2" se refiere a un AAV que tiene al menos una proteína de la cápside de AAV de serotipo 2.

- El término "CYP4V2", se refiere al Citocromo P450 4V2 o Citocromo P450, familia 4, subfamilia V, polipéptido 2 (en ocasiones denominado CYP4AH1) y sus ortólogos en otras especies. Las mutaciones en CYP4V2 se han asociado a BCD (véase, por ejemplo, Li *et al.*, *Am J Hum Genet.* 74:817-826, 2004) y retinitis pigmentosa (véase, por ejemplo, Wang *et al.*, *PLOS ONE* 7:e33673, 2012). El gen CYP4V2 humano genómico de longitud completa tiene aproximadamente 22.053 pb de longitud y se puede encontrar en, por ejemplo, genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CYP4V2&keywords=CYP4V2 en la World Wide Web. Como se usa en el presente documento, el término "hCYP4V2" se refiere a un gen o una proteína CYP4V2 humanos. Se entenderá que
- 60 hCYP4V2 y CYP4V2 pueden referirse a un gen o proteína que contiene una alteración genética o epigenética o a un gen o proteína que no contiene una alteración genética o epigenética.

- Como se usa en el presente documento, la expresión "CYP4V2 funcional" se refiere a una proteína o una molécula de nucleótido que, cuando se expresa, produce una proteína que es eficaz para proporcionar beneficios
- 65 terapéuticos (por ejemplo, para mejorar o rescatar niveles anormales de ácidos grasos (por ejemplo, nivel de DHA) en las células diana) a un individuo (por ejemplo, un individuo con una alteración genética o epigenética en una

molécula de CYP4V2). Una molécula de CYP4V2 funcional puede corresponder a una secuencia de hCYP4V2 de tipo silvestre, o a una variante de origen natural de la misma (por ejemplo, una variante polimórfica; por ejemplo, una variante que no contiene una alteración patológica), o una secuencia optimizada. En algunas realizaciones, una molécula de CYP4V2 funcional es una molécula de CYP4V2 de otra especie (por ejemplo, otro mamífero, tal como un roedor, conejo, perro, cerdo o un primate no humano) que comparte una ortología similar a la del CYP4V2 humano. Por ejemplo, un ortólogo de una secuencia de CYP4V2 humana es la secuencia de mCyp4v3 murina. En algunos ejemplos que no forman parte de la invención reivindicada, una molécula de CYP4V2 funcional es otra molécula de P450 (por ejemplo, una proteína CYP4).

La expresión "célula ocular" se refiere a cualquier célula en, o asociada a la función de, el ojo, incluyendo, sin limitación, una célula retiniana, una célula bipolar de la retina, una célula fotorreceptora o una célula progenitora de fotorreceptores (incluyendo bastones y/o conos, en conjunto "PRC"), una célula ganglionar, una célula del epitelio pigmentario retiniano (RPE), una célula epitelial coroidea (CE, por sus siglas en inglés), una célula del epitelio corneal (CEC, por sus siglas en inglés), una célula coroidea, una célula corneal o una célula del nervio óptico.

La expresión "pérdida de función" o "disfunción" se refiere a una disminución o pérdida de función celular (por ejemplo, función fotorreceptora, función de las células fotorreceptoras, función de las células del epitelio pigmentario retiniano, función del cristalino, función coroidea o función de la córnea) en comparación con una función normal, célula no enferma, o en comparación con el otro ojo o con el mismo ojo en un punto temporal anterior. Como se usa en el presente documento, "degeneración", "atrofia", "trastorno", "enfermedad", y/o "distrofia" pueden usarse como sinónimo de pérdida de función. La expresión "función aumentada" significa mejorar la función (por ejemplo, la función de los fotorreceptores, células fotorreceptoras, células del epitelio pigmentario retiniano, células coroides o células corneales), o aumentar el número o porcentaje de fotorreceptores o células funcionales (por ejemplo, células fotorreceptoras, células del epitelio pigmentario retiniano, células coroides o células corneales) en comparación con un ojo enfermo (que tiene la misma enfermedad ocular), el mismo ojo en un punto temporal anterior, una porción no tratada del mismo ojo, o el ojo contralateral del mismo paciente.

El término "transgén" se refiere a un ácido nucleico donante que está destinado o ha sido introducido en una célula u organismo. Los transgenes incluyen cualquier gen, tal como un gen o ADNc expuesto en la Tabla 4.

Las expresiones "formulación farmacéuticamente aceptable" y "formulación fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" significan una formulación biológicamente aceptable, gaseosa, líquida o sólida, o mezcla de los mismos, que sea adecuada para una o más vías de administración, suministro *in vivo*, suministro o contacto *in vitro*, y puede incluir una formulación o portador utilizado en terapias para otras enfermedades (por ejemplo, terapia génica o terapia celular para otras enfermedades oculares). Una composición "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" es un material que no es indeseable biológicamente o de otro modo, por ejemplo, el material puede administrarse a un sujeto sin producir un efecto biológico indeseable sustancial. Por tanto, dicha composición farmacéutica puede usarse, por ejemplo en la administración de una proteína, un polinucleótido, un plásmido, un vector vírico o una nanopartícula a una célula o un sujeto. Dichas composiciones incluyen, sin limitación, disolventes (acuosos o no acuosos), soluciones (acuosas o no acuosas), emulsiones (por ejemplo, de aceite en agua o de agua en aceite), suspensiones, jarabes, elixires, medios de dispersión y suspensión, recubrimientos, agentes isotónicos y promotores o retardadores de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica o el contacto o suministro *in vivo* o *in vitro*. Los disolventes, soluciones y suspensiones acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión, agentes lubricantes y agentes espesantes. Dichos portadores farmacéuticamente aceptables incluyen comprimidos (recubiertos o no recubiertos), cápsulas (duras o blandas), micropelotas, polvo, gránulos y cristales. También se pueden incorporar a las composiciones compuestos activos suplementarios (por ejemplo, agentes conservantes, antibacterianos, antivíricos y antifúngicos e inmunosupresores). Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para que sean compatibles con una vía particular de administración o suministro, como se expone en el presente documento o como sabe un experto en la materia. Por tanto, las composiciones incluyen portadores, diluyentes o excipientes adecuados para la administración por diversas vías.

El término "ARNcr" se refiere a ARN de CRISPR, que contiene tanto el elemento protoespaciador como nucleótidos adicionales que son complementarios al ARNtracr.

El término "ARNtracr" se refiere a ARNcr transactivador, que se hibrida con el ARNcr y se une a una proteína Cas9, activando el complejo para crear roturas bicatenarias en sitios específicos dentro de la secuencia genómica.

El término "ARNgu" se refiere a ARN guía único, que combina el ARNcr y el ARNtracr, que son moléculas separadas en el sistema CRISPR/Cas9 nativo en *S. pyogenes*, en una única construcción de ARN.

El término "PAM" se refiere a un "motivo adyacente al protoespaciador" que es una secuencia corta en cualquiera de las cadenas del genoma reconocida por las nucleasas de CRISPR como un sitio de corte. PAM varía con la nucleasa (por ejemplo, Cas9, Cpf1, etc.). La secuencia del elemento protoespaciador por lo general está directamente en dirección 5' del sitio PAM.

La expresión "elemento protoespaciador" (también denominado "ARN guía" o "ARNg de CRISPR" o "ARNg" o g1, g2, g3, g4, g5, etc.) se refiere a la porción del ARNcr (o ARNgu) que es complementaria a la secuencia diana del ADN genómico.

DHA: Ácido docosahexaenoico, un ácido graso omega-3 poliinsaturado, también conocido como 22:6 (ω -3) o C22:6 n3.

AA: Ácido araquidónico, un ácido graso omega-6 poliinsaturado, también conocido como 20:4(ω -6) o C20:4 n6, o ARA.

PBS(+): solución salina tamponada con fosfato (PBS) con calcio y magnesio.

PBS(-): solución salina tamponada con fosfato (PBS) sin calcio ni magnesio.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Métodos y composiciones para modelos de enfermedad celular de BCD

Desarrollar un modelo adecuado de enfermedad de BCD y determinar el fenotipo a nivel molecular para la BCD es fundamental para la investigación relacionada con BCD, y para el desarrollo y ensayo de fármacos y opciones de tratamiento para la BCD. También es importante para el estudio de la función de CYP4V2. Como se describe en la sección Antecedentes del presente documento, el fenotipo clínico de BCD se ha caracterizado, establecido y estudiado desde hace 80 años, las mutaciones genéticas que provocan la BCD se han identificado durante una década. Sin embargo, todavía existe una brecha entre el fenotipo clínico (por ejemplo, depósitos similares a cristales en la retina de los pacientes con BCD) y las mutaciones de CYP4V2 subyacentes.

Estudios anteriores sobre la BCD han encontrado niveles anormales de ácidos grasos en pacientes con BCD, incluyendo en fibroblastos, linfocitos y suero. Por ejemplo, en Lee *et al.*, *The Metabolism of Fatty Acids in Human Bietti Crystalline Dystrophy*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* Julio de 2001; 42(8):1707-14, los investigadores usaron un método de seguimiento de pulsos para estudiar anomalías en los fibroblastos y linfocitos de pacientes con BCD. Los fibroblastos y linfocitos del paciente con BCD y del control normal se incubaron con [(14)C]18:3n-3 o [(14)C]18:2n-6. Los fibroblastos de pacientes con BCD mostraron una conversión más baja de 18:3n-3, pero no de 18:2n-6, en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) que los de sujetos normales. En otro estudio (Lai *et al.*, *Alterations in Serum Fatty Acid Concentrations and Desaturase Activities in Bietti Crystalline Dystrophy Unaffected by CYP4V2 Genotypes*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2010; 51:1092-7), los investigadores usaron CG-EM para analizar las concentraciones de ácidos grasos séricos en muestras de suero de pacientes con BCD y de control. El estudio encontró una concentración más alta de ácido octadecanoico (18:0) en el suero de los pacientes con BCD que en los sujetos de control, así como una menor concentración de ácido octadecadienoico (18:1n-9) que la de los sujetos de control. Asimismo, la concentración total de ácidos grasos monoinsaturados fue significativamente menor en la BCD que en el control. Sin embargo, en otro estudio (Nakano *et al.*, *CYP4V2 in Bietti's Crystalline Dystrophy: Ocular Localization, Metabolism of omega-3-Polyunsaturated Fatty Acids, and Functional Deficit of the p.H331P Variant*, *Mol Pharmacol* 82:679-686, 2012) que no usó muestras de pacientes con BCD como sujeto de estudio, los resultados sugirieron que la enzima CYP4V2 posee actividad omega-hidroxilasa hacia los AGPI-omega-3.

Es importante confirmar si los niveles anormales de ácidos grasos encontrados en los fibroblastos y el suero de los pacientes con BCD realmente existen en las células RPE de los pacientes con BCD, que son las células que provocan enfermedad para la BCD. Por lo tanto, se desea un modelo de enfermedad de BCD que permita la investigación directa en células RPE de pacientes con BCD para obtener una mayor comprensión de la patología de la enfermedad BCD y las funciones de CYP4V2, así como para evaluar la eficacia de posibles opciones de tratamiento. Sin embargo, dada la ubicación del RPE y la rareza de la BCD, no es práctico obtener células RPE nativas de pacientes con BCD.

La presente divulgación proporciona modelos celulares de BCD y métodos para generar modelos celulares de BCD. Los modelos celulares de BCD consisten en células madre específicas de paciente con BCD (incluyendo, sin limitación, células madre pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés), células madre embrionarias (ES, por sus siglas en inglés), células madre somáticas (o adultas), células madre mesenquimáticas (MSC, por sus siglas en inglés)) y células oculares (incluyendo, sin limitación, células RPE, células fotorreceptoras (conos o bastones), células progenitoras de fotorreceptores, células del epitelio corneal, células del cristalino y/o células coroides) derivadas de cualquier célula madre de un paciente con BCD. Además de las células madre específicas de paciente, el modelo celular de BCD también se puede generar mediante la creación de mutaciones artificiales de CYP4V2 en células de individuos que no tienen BCD y dichas células pueden ser células ES, células iPS u otras células madre, o cualesquier células que puedan reprogramarse en células madre, o cualesquier células oculares (ya sean derivadas de una célula madre o no).

La tecnología de células madre pluripotentes inducidas proporciona una alternativa para el modelado de

enfermedades en modelos en animales. Sin embargo, no todas las enfermedades se han modelado con éxito usando iPSC. (Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G. Q. y Benvenisty, N. *Differential Modeling of Fragile X Syndrome by Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells. Cell Stem Cell* 6, 407-411 (2010)). Asimismo, dado el anabolismo de ácidos grasos informado asociado a BCD, no estaba claro si la tecnología de iPS puede generar células iPS específicas de paciente con BCD o células iPS-RPE específicas de paciente.

A. Inducción de la pluripotencia

En la técnica se conocen métodos para producir células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Pueden usarse prácticamente todos los tipos de células somáticas como célula de origen para la reprogramación de iPSC. Brevemente, las iPSC se pueden producir introduciendo un conjunto particular de proteínas (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican un conjunto particular de proteínas o mediante suministro directa de proteínas) en células. El artesano experto entenderá que un método no limitante de ejemplo es mediante la introducción de uno o más transgenes que codifican uno o más de OCT4, SOX2, KLF4 y/o c-MYC (por ejemplo, los "factores de Yamanaka"). La reprogramación puede usar los cuatro factores de transcripción. También pueden usarse uno, dos o tres factores de transcripción. Li *et al.*, *Stem Cells*, 2009; 27:2992-3000. Zhu *et al.*, *Cell Stem Cell* 2010;7: 651-655. Las iPSC pueden generarse mediante el suministro directo de las proteínas de reprogramación. Kim *et al.*, *Cell Stem Cell*. 2009; 4(6):472-6. La sección de Ejemplos proporciona métodos para producir iPSC usando métodos no integradores, por ejemplo, mediante el virus Sendai (Ejemplo 1), o mediante métodos episómicos (Ejemplo 2). Se contempla cualquier método de producción de iPSC, sin embargo, en el alcance de la presente divulgación.

Pueden usarse diversos métodos (por ejemplo, virus Sendai, método episómico, con o sin moléculas pequeñas) para generar iPSC, véase la sección de Ejemplos, véase también, por ejemplo, Hubbard *et al.*, *J. Vis. Exp.*, 2014, 92:52009. Asimismo, en la técnica se conocen métodos para producir iPSC a partir de varios tipos celulares diferentes. Véase, por ejemplo, Hayashi *et al.*, 2012, *PLoS One*, 7(9): e45435; Poon *et al.* 2015, *PLoS One*, 10(7): e0131288; Lamba *et al.* 2010, *PLoS One*, 5(1): e8763. Normalmente, las iPSC expresan niveles detectables de al menos un marcador incluyendo, sin limitación, Oct-4, Sox-2, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, AP y/o NANOG.

Puede usarse cualquier tipo de células madre para generar el modelo celular de BCD descrito en el presente documento, incluyendo, sin limitación, células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés), células madre embrionarias (ES, por sus siglas en inglés), células madre mesenquimáticas, células madre adultas o células madre histoespecíficas. Las células madre para su uso en los métodos descritos en el presente documento pueden ser células madre pluripotentes, multipotentes o totipotentes, en donde las células madre totipotentes son células madre no humanas.

Como se usa en el presente documento, el término "pluripotente" se refiere a una célula capaz de al menos desarrollarse a una de entre células ectodérmicas, endodérmicas y mesodérmicas. En una realización, el término "pluripotente" se refiere a células que son totipotentes y multipotentes. Como se usa en el presente documento, el término célula "totipotente" se refiere a una célula capaz de desarrollarse en todos los linajes de células. Como se usa en el presente documento, el término "multipotente" se refiere a una célula que no está diferenciada terminalmente. Las células pluripotentes de la divulgación del presente documento pueden ser cualesquier células madre o producidas a partir de células no pluripotentes, tales como fibroblastos, usando métodos de inducción, desdiferenciación y transferencia nuclear conocidos en la técnica. Las células pluripotentes descritas en el presente documento, ya sean células madre o producidas a partir de células no pluripotentes, pueden ser de un sujeto que tiene BCD o que tiene mutaciones de CYP4V2, o de un individuo sano que no tiene BCD para su uso como control o para su uso para crear mutaciones artificiales de CYP4V2.

Prácticamente cualquier tipo de células se puede reprogramar en células iPS. Véase el análisis en la subsección titulada "Origen de las células" en el presente documento.

B. Diferenciación de iPSC

Las células iPS de pacientes con BCD se diferenciaron en células iPS-RPE (u otro tipo de células oculares (por ejemplo, células iPS-CEC, iPS-CE o iPS-PRC)). Se conocen métodos para diferenciar iPSC en células RPE u otro tipo de célula ocular (por ejemplo, CEC y PRC). Véase, por ejemplo, la sección de Ejemplos; Hayashi *et al.*, 2012, *PLoS One*, 7(9):e45435; Songstad, *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* Diciembre de 2015, Vol. 56, 8258-8267; y Lamba *et al.*, *PLoS One*. 20 de enero de 2010; 5(1):e8763. Por ejemplo, las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) reprogramadas a partir de células se pueden producir y diferenciar adicionalmente en, por ejemplo, células RPE (denominadas en el presente documento "iPS-RPE"), células epiteliales corneales (denominadas en el presente documento "iPS-CEC"), células fotorreceptoras (o progenitores de fotorreceptores; denominados en el presente documento "iPS-PRC") o células iPS-endoteliales coroides (CE) (denominadas "iPS-CE")

Las células diferenciadas, por ejemplo, células iPS-RPE, se sometieron a ensayo en cuanto a sus funciones bioquímicas (como se describe en el presente documento y en la sección de Ejemplos) para evaluar sus defectos/anomalías bioquímicos en comparación con las células iPS-RPE de controles sanos.

Las estirpes celulares iPS-RPE producidas como se describe en el presente documento presentan la morfología (por ejemplo, pigmentación y forma hexagonal) y/o expresan uno o más biomarcadores que son indicativos de células RPE. Se conocen biomarcadores para células RPE (y células iPS-RPE) e incluyen, sin limitación, uno o más de RLBP1 (también conocido como CRALBP), RPE65, BESTROFINA-1, MITF, VINCULINA, LRAT, RDH5, PAX6, MERTK, TYR y/o ZO-1, y pueden usarse para determinar o confirmar que se ha producido la diferenciación del RPE. De forma similar, se conocen biomarcadores para CEC (e iPS-CEC) y PRC (e iPS-PRC) e incluyen, por ejemplo, citoqueratina 12 y citoqueratina 3 para las células epiteliales corneales; y Crx para fotorreceptores, recoverina para bastones y conos, y Nrl para bastones.

A través de la reprogramación de iPS y los métodos de diferenciación de RPE como se describe en la sección de Ejemplos, Se generaron con éxito células iPS e iPS-RPE específicas de paciente con BCD.

C Un ensayo bioquímico para identificar defectos/anomalías bioquímicos y un ensayo de viabilidad celular para evaluar la atrofia del RPE en células iPS-RPE de pacientes con BCD

Se desarrolló y usó un conjunto de ensayos bioquímicos para evaluar y determinar el fenotipo en las células iPS-RPE específicas de paciente con BCD.

En primer lugar, en el ensayo bioquímico de los presentes inventores se incluyó una lista más completa de ácidos grasos. En un estudio anterior se identificaron niveles anormales de ácidos grasos séricos en pacientes con BCD, las muestras se analizaron para detectar los siguientes ácidos grasos, 16:0, 16:1, 18:0, 18:1n-9, 18:2n-6, 18:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-6, 22:5n-3, 22:6n-3, 24:0 y 24:1. El estudio encontró una concentración más alta de ácido octadecanoico (18:0) en el suero de los pacientes con BCD que en los sujetos de control, así como una menor concentración de ácido octadecadienoico (18:1n-9) que la de los sujetos de control. Para determinar si existen las mismas anomalías de ácidos grasos en las células iPS-RPE específicas de paciente con BCD y si hay más anomalías en otros ácidos grasos, se desarrolló un ensayo bioquímico que abarca más ácidos grasos (véase la Tabla 2) usando CL-EM.

Además, para determinar si las células iPS-RPE específicas de paciente con BCD albergan otras anomalías además de los ácidos grasos, se incluyeron otras especies de lípidos en el ensayo, incluyendo, ceramidas (Cer), esfingomielinas (SM) y esfingosina y esfinganina (SOSA), para analizar el fenotipo en el modelo de enfermedad de BCD y para determinar las funciones bioquímicas de la proteína CYP4V2. Véase la Tabla 2 para obtener una lista de diferentes especies y compuestos incluidos en el ensayo bioquímico utilizado para someter a ensayo las células iPS-RPE específicas de paciente con BCD.

Sorprendentemente, los resultados de los ensayos (véase la sección de Ejemplos) mostraron que las células iPS-RPE específicas de paciente con BCD tienen un perfil de anomalías de ácidos grasos diferente del encontrado en el suero de los pacientes con BCD.

El ojo es el órgano sensor de luz del cuerpo humano. La BCD comienza con atrofia del RPE, lo que a su vez provoca la muerte de los fotorreceptores y la pérdida de la visión. Una función clave del RPE es la absorción de luz (Strauss, 2005, *The retinal pigment epithelium in visual function*. *Physiol Rev* 85:845-81). La exposición a la luz ambiental puede afectar al desarrollo y a la progresión de degeneraciones de la retina humana, tales como la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE) y la retinitis pigmentosa (RP). El uso de exposición a la luz en modelos de enfermedades oculares es un sistema de modelo adecuado para estudiar las degeneraciones de la retina. La exposición a la luz, incluyendo la exposición a la luz azul, se ha utilizado ampliamente en la investigación de la retina (*Dual roles of polyunsaturated fatty acids in retinal physiology and pathophysiology associated with retinal degeneration*, Masaki Tanito y Robert Anderson (2009) *Clinical Lipidology*, 4:6, 821-827. Seko, et al., *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. Enero de 2001; 239 (1): 47-52. *Blue light-induced apoptosis in cultured retinal pigment epithelium cells of the rat*. Narimatsu, et al., *Exp Eye Res*. Marzo de 2015; 132:48-51. *Blue light-induced inflammatory marker expression in the retinal pigment epithelium-choroid of mice and the protective effect of a yellow intraocular lens material in vivo*). La luz azul existe en la luz ambiental, tal como la luz solar, y la iluminación artificial (por ejemplo, iluminación de oficinas), así como de dispositivos de visualización electrónicos tales como televisores, monitores, teléfonos inteligentes, portátiles y tabletas (Moon, et al., *Blue light effect on retinal pigment epithelial cells by display devices*, *Integr Biol* (Camb). 2017, 22; 9(5):436-443. doi: 10.1039/c7ib00032d).

En este estudio, el ensayo de viabilidad celular descubrió atrofia del RPE en el modelo celular de BCD. La exposición a la luz (azul) provocó una muerte celular significativamente mayor en las muestras de iPS-RPE de pacientes con BCD que en las muestras de control. El fenotipo clínico de BCD (es decir, atrofia del RPE) es evidente en el modelo celular de BCD. AAV.CYP4V2 demostró eficacia para rescatar la atrofia del RPE en el modelo celular de BCD.

D. Aplicaciones del modelo celular de BCD

Además de evaluar el fenotipo a nivel celular asociado a BCD, el modelo celular de BCD puede usarse para otras aplicaciones de un modelo de enfermedad, incluyendo, sin limitación, cribar fármacos, desarrollar agentes o dispositivos terapéuticos, determinar intervalos de dosificación, ensayos de seguridad y toxicidad, someter a ensayo diferentes formulaciones para la BCD u otras afecciones relacionadas con CYP4V2, o el estudio de las funciones y usos de CYP4V2, incluyendo, sin limitación, desarrollar y cribar fármacos que comprendan o expresen la proteína CYP4V2, por ejemplo, terapia génica con CYP4V2. Además, pueden usarse iPS-RPE específicas de paciente con BCD (y otras células oculares derivadas de células madre específicas de paciente con BCD, incluyendo, sin limitación, células iPS-fotorreceptoras, iPS-células corneales) como terapia celular, ya sea en forma no modificada o después de reparación genética (por ejemplo, mediante transferencia génica o edición génica como se describe en el presente documento). La sección de Ejemplos proporciona ejemplos no limitantes de aplicaciones del Modelo Celular de BCD.

E. Métodos de cribado de compuestos

De manera significativa, las estirpes celulares iPSC-RPE descritas en el presente documento pueden proporcionar modelos de enfermedades celulares humanas (por ejemplo, BCD, retinitis pigmentosa, IRD). Dichas células iPSC-RPE, células iPSC-CEC o células iPSC-PRC, que pueden denominarse colectivamente "células iPSC-oculares", pueden usarse para diagnosticar, pronosticar, predecir el inicio, la gravedad y la tasa de progresión de la enfermedad de un paciente con BCD o de un paciente con retinitis pigmentosa o de un paciente que tiene otro tipo de enfermedad retiniana hereditaria. Por ejemplo, dichas estirpes celulares iPSC-oculares también pueden usarse para cribar compuestos de ensayo en busca de aquellos que podrían tener eficacia terapéutica para tratar o prevenir enfermedades asociadas a alteraciones genéticas o epigenéticas en un ácido nucleico de CYP4V2 (por ejemplo, BCD).

Las células pluripotentes descritas en el presente documento, particularmente aquellas producidas a partir de un sujeto que tiene una alteración genética o epigenética en CYP4V2 o un sujeto que tiene una enfermedad ocular (por ejemplo, BCD), pueden usarse como herramienta de investigación en métodos para identificar compuestos que son candidatos terapéuticos para el tratamiento, el diagnóstico, el pronóstico o la prevención de la enfermedad ocular (por ejemplo, BCD). Se entenderá que los compuestos de ensayo pueden ser cualquier tipo de compuestos. Pueden ser de origen natural o pueden haber sido producidos mediante síntesis química. Pueden ser una biblioteca de compuestos químicos estructuralmente definidos, de compuestos o sustancias no caracterizadas, o una mezcla de compuestos. Un experto en la materia apreciará que los compuestos de ensayo pueden ser, sin limitación, ácidos nucleicos o análogos de los mismos, polipéptidos o análogos de los mismos, anticuerpos, sustancias químicas y moléculas pequeñas.

Las células descritas en el presente documento, en presencia o ausencia de un compuesto de ensayo, pueden evaluarse en cuanto a su capacidad para crecer y actuar en un modelo animal (por ejemplo, en el ojo de un modelo animal) y en cuanto a su propensión, o falta de propensión, para formar tumores. Pueden usarse varios métodos para evaluar las células, incluyendo, sin limitación, técnicas de PCR, inmunoensayos y/o análisis del metabolismo de lípidos/ácidos grasos.

Métodos y composiciones para terapias celulares

Como se analiza en el presente documento, la terapia génica con CYP4V2 demostró eficacia en la corrección de anomalías bioquímicas en células iPS-RPE específicas de paciente con BCD. Sin embargo, un requisito previo para que la terapia génica funcione *in vivo* es que al sujeto todavía le queden algunas células fotorreceptoras y RPE en el ojo que se está tratando. Para pacientes con BCD en fase avanzada a quienes les quedan pocas o ninguna célula RPE o células fotorreceptoras en el ojo, la terapia celular puede usarse como alternativa o en combinación con la terapia génica como opción de tratamiento.

La terapia celular implica trasplantar nuevas células para reemplazar las células muertas o degeneradas. Para la BCD, las células nuevas pueden ser células RPE, células fotorreceptoras (conos y/o bastones), células progenitoras de fotorreceptores, células coroideas, células del epitelio corneal, células del cristalino u otros tipos celulares oculares, dependiendo de qué tipo de células hayan mostrado degeneración y necesiten un reemplazo en el sujeto. La siguiente descripción y los Ejemplos del presente documento usaron células iPS-RPE para ilustrar los métodos y procesos. Se pueden aplicar a otro tipo de células oculares.

La terapia celular para la BCD y otros tipos de enfermedades oculares incluyendo, sin limitación, enfermedades retinianas hereditarias (IRD), retinitis pigmentosa (RP), degeneración macular (incluyendo degeneración macular relacionada con la edad (DME)), se puede clasificar de la siguiente manera.

(1) Trasplante alógeno:

En una realización, pueden usarse células RPE, PRC, CEC, CE y otras células oculares derivadas de células madre embrionarias (ESC) o iPSC de un donante sano en trasplantes alógenos como terapia celular para la BCD. Implica diferenciar una ESC o iPSC sana de un individuo sano (es decir, uno sin mutaciones de CYP4V2) en

células RPE y trasplantar dichas células ESC-RPE al ojo de un paciente con BCD. En la sección de Ejemplos se proporcionan métodos para reprogramar iPSC y diferenciar ESC o iPSC en RPE. En un estudio anterior, se han utilizado células RPE derivadas de células madre embrionarias (ESC) para tratar la degeneración macular relacionada con la edad (DME), véase, Schwartz *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* Abril de 2016, Vol. 57, ORSFc1-ORSFc9. Las ventajas de un aloinjerto o trasplante alógeno es que es menos caro que el autotrasplante porque puede usarse una fuente común para tratar a varios pacientes. Sin embargo, tiene desventajas importantes, tales como que el rechazo inmunitario por parte del sujeto hospedador puede afectar significativamente a su eficacia y duración. Asimismo, requiere inmunosupresores a largo plazo que pueden provocar efectos secundarios sistémicos graves. Por último, el uso de ESC puede dar lugar a preocupaciones éticas.

(2) Trasplante autólogo sin reparación genética:

En una realización, las células autólogas pueden usarse en la terapia celular para la BCD. Una de esas fuentes autólogas son las células iPS y las células iPS-RPE derivadas de un paciente con BCD, que se pueden trasplantar al ojo de dicho paciente con BCD. La BCD es una enfermedad de aparición relativamente tardía. Los síntomas en pacientes con BCD por lo general se desarrollan en la 2.^a, 3.^a o incluso 4.^a década de la vida. Asimismo, el proceso de reprogramación de iPS tiene cierto grado de efecto de "reinicio del reloj" en las células iPS y en las células derivadas de las células iPS. Por lo tanto, las células iPS-RPE y otras células iPS-oculares derivadas de un paciente con BCD pueden usarse como terapia celular para trasplante al paciente con BCD incluso sin ninguna reparación genética de las mutaciones de CYP4V2 en las células iPS-RPE. Se proporcionan métodos de reprogramación de iPS y diferenciación de RPE en la sección Ejemplos del presente documento. Como precaución, puede realizarse la secuenciación del genoma completo para comparar el ADN genómico en las células iPS o iPS-RPE y el ADN genómico en la célula de origen (por ejemplo, fibroblastos o células sanguíneas) si existe alguna enfermedad que provoque mutaciones creadas durante la reprogramación de iPS y el proceso de diferenciación de RPE.

(3) Células autólogas de pacientes reparadas genéticamente para la terapia celular para la BCD y otros tipos de IRD y RP

La divulgación del presente documento proporciona métodos y composiciones para generar células autólogas reparadas genéticamente para terapia celular. Como se usa en el presente documento, "reparado genéticamente" o "reparación genética" se refiere a la corrección de las mutaciones de CYP4V2 mediante la edición génica del genoma del paciente (por ejemplo, directamente en el cromosoma usando, por ejemplo, CRISPR/Cas9, CRISPR/Cpf1, Dedos de cinc, TALEN), o mediante la transferencia génica de una copia sana del gen CYP4V2 (ADNc, ARN u otra forma) a la célula del paciente, que normalmente no se integra en el genoma (por ejemplo, la terapia génica con CYP4V2 como se describe en el presente documento) ni corrige o compensa el ARNm defectuoso en la célula del paciente.

Como enfermedad provocada por mutaciones genéticas, lo ideal es que las células autólogas para su uso en la terapia celular para la BCD u otra IRD o RP tengan sus defectos genéticos (es decir, las mutaciones de CYP4V2) y/o su proteína CYP4V2 disfuncional reparadas antes del trasplante. En una realización, dicha reparación genética se puede lograr mediante terapia de transferencia génica como se analiza en el presente documento, incluyendo, sin limitación, una transferencia de terapia génica mediada por AAV de una secuenciación de ácido nucleico que codifica y expresa una proteína CYP4V2 funcional. Se proporcionan composiciones y métodos de la terapia de transferencia génica de CYP4V2 en el presente documento, véase la descripción detallada en el presente documento y la sección de Ejemplos. La célula de origen de BCD específica del paciente, las células iPS o las células iPS-RPE pueden tratarse con AAV.CYP4V2 (como se proporciona en el presente documento), seguido de reprogramación de iPS y/o diferenciación de RPE (si corresponde) y verificación de funciones bioquímicas mejoradas (como se proporciona en el presente documento) y después se trasplantarán al ojo del mismo paciente. En otra realización, dicha reparación genética se puede lograr mediante la edición génica, por ejemplo, corregir la mutación o mutaciones de CYP4V2 en el genoma o ARN en las células del paciente con BCD. Además de aplicarse *in vitro* como parte de una terapia celular, dicha edición génica también puede aplicarse directamente *in vivo* como terapia génica. Dicha edición génica puede realizarse en la célula de origen del paciente (por ejemplo, fibroblastos o células sanguíneas), iPS, iPS-RPE u otros tipos de células iPS-oculares. La reprogramación de iPS y la diferenciación de RPE para generar iPS e iPS-RPE específicas de paciente pueden realizarse antes o después de la reparación genética (por ejemplo, terapia de transferencia génica o edición génica).

La divulgación del presente documento proporciona composiciones y métodos para corregir una mutación de CYP4V2 a través de edición génica. La descripción en la sección de Ejemplos del presente documento ilustra las composiciones y métodos que usan una construcción CRISPR/Cas9 para corregir la mutación c.802-8_810del17insGC, la mutación más común entre los pacientes con BCD. También puede aplicarse a otros métodos de edición génica (por ejemplo, CRISPR/Cpf1, TALEN, Dedo de cinc) y otras mutaciones de IRD (por ejemplo, sin limitación, otras mutaciones de CYP4V2 de la Tabla 1) en combinación con métodos conocidos en la técnica.

La mutación de CYP4V2 más común entre los pacientes con BCD es c.802-8_810del17insGC (que se refiere a

una delección de 17 bases con dos bases (GC) insertadas en el lugar que comienza a 8 bases del final del intrón 6 del gen CYP4V2, también conocida como IVS6-8 del/insGC, Véase la SEQ ID NO: 46 que muestra la secuencia de la región de ADN genómico de CYP4V2 humano que comprende la mutación c.802-8_810del17insGC y la SEQ ID NO: 47 que muestra la secuencia de tipo silvestre correspondiente. La mutación c.802-8_810del17insGC se ilustra en la siguiente secuencia que muestra la unión intrón 6-exón 7 del CYP4V2 humano. La secuencia del intrón 6 se muestra en minúsculas y la secuencia del exón 7 en mayúsculas. La delección de 17 pb y la inserción de GC están entre paréntesis): caa aca gaa gca tgt gat tat cat tca aa (tca tac agG TCA TCG CT) (GC) GAA CGG GCC AAT GAA ATG AAC GCC AAT GA) (SEQ ID NO: 46) dando como resultado la omisión prevista del exón 7. (Xiao *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 409:181-6, 2011; Meng *et al.*, 2014, *Mol. Vis.*, 20:1806-14; Wada *et al.*, *Am J Ophthalmol.* 139:894-9, 2005; Jiao *et al.*, *European Journal of Human Genetics* (2017) 25, 461-471). Un estudio reciente estimó que la edad de la mutación c.802-8_810del17insGC sería de 1.040-8.200 generaciones en la población china y de 300-1.100 generaciones en la población japonesa. Véase Jiao *et al.*, *European Journal of Human Genetics* (2017) 25, 461-471.

Puede usarse terapia celular (también conocida como terapia celular o citoterapia) como se describe en el presente documento para tratar o prevenir una enfermedad ocular en un sujeto. Como se describe en el presente documento, la BCD, determinadas RP, IRD y otras enfermedades oculares mencionadas en el presente documento se asocian a una alteración genética o epigenética en una secuencia de ácido nucleico de CYP4V2.

La terapia celular generalmente implica inyectar, implantar, trasplantar o suministrar de otro modo una composición que incluye células a un sujeto (por ejemplo, en un tejido u órgano de un paciente (por ejemplo, un ojo)). Los métodos descritos en el presente documento son únicos porque permiten la terapia con células autólogas reparadas genéticamente de un sujeto que tiene una enfermedad ocular.

En el presente documento se describen métodos que incluyen la obtención de células de un sujeto que tiene una enfermedad ocular (por ejemplo, asociada a una alteración genética o epigenética en una secuencia de ácido nucleico de CYP4V2) y la reparación de la mutación o mutaciones dentro del ácido nucleico de CYP4V2 (por ejemplo, ADN o ARN) usando, por ejemplo, edición génica o reparación mediante el suministro de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CYP4V2 funcional (por ejemplo, transferencia génica). Las células pueden volverse pluripotentes (por ejemplo, mediante inducción de pluripotencia, por ejemplo, para producir iPSC) y diferenciarse en una o más células oculares (por ejemplo, iPS-RPE, iPS-CEC, iPS-PRC) antes de la administración nuevamente al sujeto (por ejemplo, en el ojo del sujeto). Se apreciará que las células pueden repararse genéticamente antes o después de hacerse pluripotentes, o después de diferenciarse en las células oculares.

A. Origen de las células

En algunos casos, pueden usarse células autólogas (por ejemplo, células específicas del sujeto (por ejemplo, paciente)) en los métodos de terapia celular descritos en el presente documento. Por ejemplo, pueden obtenerse células tales como fibroblastos o células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de un sujeto y usarlas para producir iPSC como se describe en la sección de Ejemplos. Pueden usarse prácticamente todos los tipos celulares para generar iPSC y, por lo tanto, como células de origen. En algunos casos, pueden usarse células obtenidas de la orina (véase, por ejemplo, Zhou *et al.*, 2012, *Nat. Protoc.*, 7:2080-9) o folículos pilosos o células de la papila dérmica (véase, por ejemplo, Muchkaeva *et al.*, 2014, *Acta Naturae*, 6:45-53) para producir iPSC.

B. Inducción de la pluripotencia

En la técnica se conocen métodos para producir células madre pluripotentes inducidas (iPSC). Brevemente, las iPSC se pueden producir introduciendo un conjunto particular de proteínas (por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican un conjunto particular de proteínas) en células. El artesano experto entenderá que un método no limitante de ejemplo es mediante la introducción de uno o más transgenes que codifican OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC (por ejemplo, los "factores de Yamanaka"). La reprogramación puede usar los cuatro factores de transcripción. También pueden usarse uno, dos o tres factores de transcripción. Li *et al.*, *Stem Cells*, 2009; 27:2992-3000. Zhu *et al.*, *Cell Stem Cell* 2010;7: 651-655. Las iPSC pueden generarse mediante el suministro directo de las proteínas de reprogramación. Kim *et al.*, *Cell Stem Cell*. 2009; 4(6):472-6. La sección de Ejemplos proporciona un método para producir iPSC usando métodos no integradores, por ejemplo, mediante el virus Sendai (Ejemplo 1), o mediante métodos episómicos (Ejemplo 2). Se contempla cualquier método de producción de iPSC, sin embargo, dentro del alcance de la presente divulgación.

Pueden usarse diversos métodos (por ejemplo, virus Sendai, método episómico, con o sin moléculas pequeñas) para generar iPSC, véase la sección de Ejemplos, véase también, por ejemplo, Hubbard *et al.*, *J. Vis. Exp.*, 2014, 92:52009. Asimismo, en la técnica se conocen métodos para producir iPSC a partir de varios tipos celulares diferentes. Véase, por ejemplo, Hayashi *et al.*, 2012, *PLoS One*, 7(9): e45435; Poon *et al.* 2015, *PLoS One*, 10(7): e0131288; Lamba *et al.* 2010, *PLoS One*, 5(1): e8763. Normalmente, las iPSC expresan niveles detectables de al menos un marcador incluyendo, sin limitación, Oct-4, Sox-2, SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81, AP y/o NANOG.

Puede usarse cualquier tipo de células madre en los métodos de terapia celular descritos en el presente documento, incluyendo, sin limitación, células madre pluripotentes inducidas (iPSC), células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés), células madre embrionarias (ES, por sus siglas en inglés), células madre mesenquimáticas, células madre adultas o células madre histoespecíficas. Las células madre para su uso en los métodos descritos en el presente documento pueden ser células madre pluripotentes, células madre multipotentes o totipotentes.

Como se usa en el presente documento, el término "pluripotente" se refiere a una célula capaz de al menos desarrollarse a una de entre células ectodérmicas, endodérmicas y mesodérmicas. En una realización, el término "pluripotente" se refiere a células que son totipotentes y multipotentes. Como se usa en el presente documento, el término célula "totipotente" se refiere a una célula capaz de desarrollarse en todos los linajes de células. Como se usa en el presente documento, el término "multipotente" se refiere a una célula que no está diferenciada terminalmente. Las células pluripotentes de la presente invención pueden ser cualesquier células madre o producidas a partir de células no pluripotentes, tales como fibroblastos, usando métodos de inducción, dediferenciación y transferencia nuclear conocidos en la técnica. Las células pluripotentes descritas en el presente documento, ya sean células madre o producidas a partir de células no pluripotentes, pueden ser de un sujeto que tiene BCD o que tiene mutaciones de CYP4V2 o de un individuo sano.

Las iPSC pueden caracterizarse por uno o más de los siguientes: a. la morfología única de iPSC; b. uno o más marcadores de pluripotencia, tales como Oct-4, Sox-2, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, Nanog y AP; c. la capacidad de diferenciarse en el tipo de célula deseado (por ejemplo, células RPE) y/o d. un ensayo de teratoma. No todo lo anterior es necesario para caracterizar las iPSC y validar la pluripotencia (por ejemplo, teratoma; véase, por ejemplo, Buta *et al.*, 2013, *Stem Cell Res.*, 11(1):552-562).

C. Edición génica

Pueden usarse varias tecnologías de edición génica en los métodos descritos en el presente documento para reparar una alteración genética o epigenética presente en el ácido nucleico de CYP4V2 de un sujeto. La edición génica puede realizarse usando cualquier número de tecnologías, incluyendo la tecnología de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas e interespaciadas regularmente (CRISPR) (véanse, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. n.º 8.697.359; 8889418; 8999641; y el documento US 2014/0068797), tecnología de nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALEN) (véase, por ejemplo, Li *et al.*, 2011, *Nucleic Acids Res.*, 39(14):6315-25) o tecnología de nucleasa de dedos de cinc (véase, por ejemplo, Wright *et al.*, 2005, *The Plant J.*, 44:693-705).

Para lograr la edición génica usando la tecnología CRISPR, pueden incorporarse ácidos nucleicos que codifican una nucleasa (por ejemplo, con frecuencia una nucleasa Cas9 pero también pueden usarse otras nucleasas (por ejemplo, otras nucleasas Cas, por ejemplo, Cpf1, o nucleasas no Cas)) en uno o más vectores y administrarse a un sujeto como se describe en el presente documento. Simplemente a modo de ejemplo, las células descritas en el presente documento (por ejemplo, células del sujeto antes de la reprogramación a iPSC, iPSC del sujeto antes de la diferenciación en RPE, células epiteliales corneales o células fotorreceptoras, o después de la diferenciación en RPE, células epiteliales corneales o células fotorreceptoras (denominadas en el presente documento "iPSC-RPE", "iPSC-CEC", o "iPSC-PRC")) se pueden transducir o transfectar con una o más construcciones (por ejemplo, vectores, RNP, ARNm) que contienen y/o codifican al menos un ARN guía (ARNg), al menos una proteína asociada a CRISPR (por ejemplo, Cas9 o Cpf1) y al menos un ácido nucleico molde donante. El ácido nucleico molde donante no es necesario, por ejemplo, cuando la reparación genética se consigue mediante inactivación génica.

De forma similar, para lograr la edición génica usando la tecnología TALEN, puede incorporarse un ácido nucleico que codifica un TALEN (por ejemplo, factor de transcripción dimérico/nucleasa) en un vector y administrarse a un sujeto como se describe en el presente documento. Análogamente, para lograr la edición génica usando la tecnología de nucleasa de dedos de cinc, puede incorporarse un ácido nucleico que codifica una ADN endonucleasa personalizada (por ejemplo, un heterodímero en el que cada subunidad contiene un dominio de dedos de cinc y un dominio de endonucleasa FokI) en uno o más vectores y administrarse a un sujeto como se describe en el presente documento.

Los componentes necesarios para realizar cada una de estas tecnologías están disponibles en el mercado y pueden personalizarse para la secuencia o secuencias diana particulares. Véase, por ejemplo, Caribou Biosciences; GenScript, CRISPR Therapeutics; Editas Medicine; Collectis Bioresearch; Life Technologies; Sangamo BioSciences; o Sigma Aldrich Chemical Co.

En las circunstancias apropiadas, la edición génica puede ocurrir de manera que la alteración genética o epigenética en el ácido nucleico de CYP4V2 de un sujeto se repare y, como resultado, se exprese una proteína CYP4V2 funcional. Una secuencia de ácido nucleico de CYP4V2 se ha reparado cuando se restablece la presencia del ácido nucleico de CYP4V2 (por ejemplo, el ARNm de CYP4V2), se restablece la presencia de la proteína CYP4V2 o se restablece la función de la proteína CYP4V2. De forma similar, "reparada", o "corregida", puede

referirse a un restablecimiento de la secuencia afectada (por ejemplo, la alteración genética o epigenética) a la secuencia de tipo silvestre o a otra secuencia no mutante como se describe en el presente documento.

Puede haber algunos casos en los que sea deseable introducir, usando edición génica, una o más mutaciones en una célula (por ejemplo, en el ácido nucleico de CYP4V2). Ésta es una forma de crear un modelo celular de enfermedad (por ejemplo, BCD). Por ejemplo, la edición génica puede realizarse en células madre embrionarias (células ES) para crear estirpes celulares con mutaciones artificiales de CYP4V2, que después pueden diferenciarse en células RPE. Como alternativa, la edición génica puede realizarse en estirpes celulares iPS de un sujeto sano (por ejemplo, un sujeto sin BCD) o en una estirpe celular RPE (por ejemplo, estirpe celular ARPE-19) para crear estirpes celulares iPS o RPE mutantes de CYP4V2.

En algunos casos, es deseable examinar las células (por ejemplo, usando la secuenciación del genoma completo) después de que se completen las etapas de edición génica para confirmar que la mutación diana se ha reparado y que no se produjo ninguna edición fuera de la diana significativa.

CRISPR y la proteína 9 asociada a CRISPR (Cas9), conocida como CRISPR-Cas9, que consiste en una nucleasa guiada por ARN (Cas9) y un ARN guía, genera roturas de ADN específicas del sitio, que son reparadas por mecanismos celulares endógenos. Los posibles resultados del enfoque incluyen la mutación de un sitio específico mediante uniones de extremos no homólogos mutagénicos (NHEJ, por sus siglas en inglés), creación de inserciones o deleciones (indels) en el sitio de la ruptura y cambio preciso de una secuencia genómica mediante recombinación homóloga (HR, por sus siglas en inglés) usando un molde donante introducido exógenamente. El ARN guía de CRISPR se compone de dos ARN denominados ARN dirigido a CRISPR (ARNcr, también denominado en el presente documento ARN de CRISPR) y ARNcr transactivador (ARNtracr). Los ARNcr normalmente tienen una longitud de aproximadamente 20 nucleótidos (nt). Se hibrida con una secuencia de ADN diana mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick y guía a la endonucleasa Cas para escindir el ADN genómico diana.

Para reparar genéticamente la mutación de CYP4V2 más común mediante edición génica, se desarrollaron diversas construcciones de corrección por CRISPR de la mutación de CYP4V2 (véase la sección de Ejemplos). Se usó CRISPR porque es más sencillo de implementar y edita con mayor eficiencia que otras formas de edición génica, tales como TALEN y nucleasas de dedos de cinc. Las construcciones de CRISPR contienen secuencias de ARNg optimizadas y validadas *in vitro* y diferentes opciones de construcción que pueden usarse fácilmente para corregir la mutación c.802-8_810del17insGC en estirpes celulares de pacientes con BCD, dando como resultado células reparadas genéticamente que pueden usarse en terapia celular, incluyendo, sin limitación, terapia de células autólogas, para la BCD.

La terapia de edición génica por CRISPR implica el uso de una proteína asociada a CRISPR (Cas), que es una nucleasa y un ARN guía de CRISPR. La función del ARN guía de CRISPR es guiar la Cas hacia la secuencia a la que se dirige el ARN guía de CRISPR a través de un elemento protoespaciador contenido en el ARN guía de CRISPR que es complementario (o específico de) la secuencia diana. Para que Cas (por ejemplo, Cas9 o Crf1) se una y se escinda en la secuencia diana o cerca de ella, también debe haber presente una secuencia de motivo adyacente al protoespaciador (PAM). Una secuencia PAM es un tramo corto de ADN (normalmente de 2-6 nucleótidos) que sirve como señal de unión para Cas. Diferentes Cas pueden tener diferentes PAM y patrones de escisión. Por ejemplo, para Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), la secuencia PAM canónica es NGG. Para *Staphylococcus aureus* (SaCas9), la secuencia PAM es NGRRT o NGRRN. Para *Neisseria meningitidis* (Nm) y *Treponema denticola* (Td), la secuencia PAM es NNNNGATT y NAAAAC, respectivamente. Una Cas modificada o mutada también puede dar como resultado una secuencia PAM alterada. Por ejemplo, la secuencia PAM de la variante SpCas9 VQR (D1135V, R1335Q y T1337R) es NGAN o NGNG. La secuencia PAM de la variante SpCas9 EQR (D1135E, R1335Q y T1337R) es NGAG. La secuencia PAM de la variante SpCas9 VRER (D1135V, G1218R, R1335E y T1337R) es NGCG. Para Cpf1, la secuencia PAM es TTTN. Normalmente, Cas genera una rotura bicatenaria (DSB, por sus siglas en inglés), pero la Cas alterada puede provocar una rotura monocatenaria (por ejemplo, SpCas9 Nickasa (Cas9n D10A)) o ninguna rotura (dCas9). Mientras que Cas9 genera extremos romos 3 nt en dirección 5' del sitio PAM, Cpf1 escinde de forma escalonada, creando un saliente 5' de 5 nucleótidos a 18-23 bases de distancia del PAM.

El ARN guía de CRISPR para Cas9 normalmente comprende un ARN de CRISPR (ARNcr) y un ARNcr transactivador (ARNtracr). El ARNcr comprende una secuencia de elemento protoespaciador que está diseñada para ser complementaria (o específica) de una secuencia diana dentro o cerca del gen diana para la corrección, alteración o reemplazo, y una secuencia que corresponde a una región complementaria del ARNtracr. El ARNtracr que comprende una región que es complementaria a la región correspondiente del ARNcr y una secuencia que interactúa con la proteína 9 asociada a CRISPR (Cas9). No se requiere ARNtracr para Cpf1.

La longitud del elemento protoespaciador normalmente es de aproximadamente 20 nucleótidos. También puede usarse una secuencia de elementos protoespaciadores más larga o más corta (aproximadamente 16-24 nt). El elemento protoespaciador puede ser un 100 % complementario a la secuencia diana o puede contener emparejamientos erróneos con la secuencia diana. Opcionalmente se puede añadir un nucleótido "G" al inicio de

la secuencia del elemento protoespaciador.

Después de que Cas escinde una molécula de ADN, puede repararse de dos maneras. Una reparación de unión de extremos no homólogos (NHEJ) propensa a errores puede dar como resultado una mutación indel que puede alterar la función de la proteína codificada por el gen. La NHEJ puede usarse para crear mutaciones artificiales en una estirpe celular. Puede usarse para crear mutaciones en el gen CYP4V2 (por ejemplo, un indel en un exón o una región aceptora de corte y empalme) de una estirpe celular (por ejemplo, una célula ES, una célula iPS o una estirpe celular ARPE-19) sin mutaciones endógenas de CYP4V2 y generar de este modo un modelo celular de enfermedad (por ejemplo, un modelo celular de BCD). Asimismo, pueden usarse dos ARN guía de CRISPR más juntos para inactivar una región diana de un gen diana o el gen diana completo, generando de este modo un modelo de inactivación. El silenciamiento génico basado en CRISPR es útil para alterar (o silenciar) un gen defectuoso, por ejemplo, en el tratamiento de una enfermedad genética dominante. Durante el silenciamiento génico, la célula intenta reparar el ADN roto, pero la NHEJ con frecuencia lo hace con errores que alteran el gen y, por lo tanto, lo silencian eficazmente. La NHEJ también puede dar como resultado la corrección de una mutación, por ejemplo, especialmente cuando la mutación es una variación de un solo nucleótido o de no más de aproximadamente 10 nucleótidos. Como alternativa, si hay disponible una secuencia de ácido nucleico donante, la rotura del ADN puede repararse mediante reparación dirigida por homología (HDR) para corregir o reemplazar el gen diana. Una secuencia de ácido nucleico donante puede proporcionarse en forma de ADN monocatenario (ADNmc, o un oligonucleótido de ADN monocatenario (ODNss) o un vector. La secuencia de ácido nucleico donante no puede tener más de aproximadamente 1 kb, 800 pb, 600 pb, 500 pb, 400 pb, 300 pb, 280 pb, 260 pb, 240 pb, 220 pb o 200 pb para una secuencia de ácido nucleico donante proporcionada en un ssODN. La secuencia de ácido nucleico donante no puede tener más de aproximadamente 25 kb, 20 kb, 15 kb, 10 kb, 9 kb, 8 kb, 7 kb, 6 kb, 5 kb, 4,5 kb, 4 kb, 3,5 kb o 3 kb para una secuencia de ácido nucleico donante proporcionada en un vector. Una secuencia de ácido nucleico donante puede ser simétrica. Una secuencia de ácido nucleico donante es asimétrica. La longitud de una secuencia de ácido nucleico donante se puede ajustar para una tasa de HDR más alta. Si el PAM al que se dirige la Cas utilizada en la edición génica por CRISPR también está presente en la secuencia de ácido nucleico donante, se puede mutar (cambiar a un nucleótido diferente) de manera que el PAM ya no exista en la secuencia de ácido nucleico donante para evitar que la Cas escinda y destruya el molde donante o la secuencia de ADN reparada mediante el molde donante. Además de corregir o reemplazar un gen mutado o defectuoso o una porción del mismo, la HDR también puede usarse para crear mutaciones artificiales en el gen CYP4V2 (por ejemplo, insertar una mutación en un exón o una región aceptora de corte y empalme) de una estirpe celular (por ejemplo, una célula ES, una célula iPS o una estirpe celular ARPE-19) sin mutaciones endógenas de CYP4V2 y generar de este modo un modelo celular de enfermedad (por ejemplo, modelo celular de BCD).

El ARN guía de CRISPR y la Cas utilizados en la terapia de edición génica por CRISPR pueden proporcionarse en un vector (por ejemplo, un plásmido (por ejemplo, pX330, pX458, pX459), un vector de AAV recombinante o un vector de lentivirus recombinante) o un ARNm que codifica dicho componente o componentes y/o ARN y forma de proteína.

El molde donante puede proporcionarse en un ADNmc (por ejemplo, ssODN) o clonarse en un plásmido u otros tipos de vectores (por ejemplo, un vector de AAV (por ejemplo, AAV2 o AAV6) para su uso en HDR.

Pueden usarse diversas composiciones y métodos para mejorar las eficiencias de edición o reparación en la diana y/o reducir el potencial fuera de la diana. Por ejemplo, pueden usarse Cas diferentes (por ejemplo, Cas9 o Cpf1) o Cas de diferentes especies (por ejemplo, SpCas9, SaCas9, NMCas9) o variantes (SpCas9, SpCas9 VQR) para ampliar las selecciones de PAM disponibles para una secuencia diana, potenciando de este modo la especificidad. Si una región de secuencia diana carece del sitio PAM NGG para SpCas9 pero es rica en AT, en su lugar, se puede considerar Cpf1. La Cas9 nickasa (por ejemplo, Cas9 D10A) solo genera una rotura monocatenaria en el ADN diana y, por lo tanto, requiere dos ARN guía de CRISPR de emparejamiento para generar una rotura bicatenaria. Este requisito aumenta drásticamente la especificidad de la diana, puesto que es poco probable que se generen dos mellas fuera de la diana lo suficientemente cerca como para provocar una DSB. Además, el molde donante asimétrico puede potenciar la tasa de HDR. La dCas9 catalíticamente inactiva no corta el ADN diana, pero aún puede lograr un reemplazo de secuencia sin ninguna de las reparaciones propensas a errores que normalmente acompañan al corte por Cas9. Véase, Richardson *et al.*, *Nature Biotechnology* 34, 339-344 (2016).

Lograr la corrección génica específica y, al mismo tiempo, evitar o minimizar la edición fuera de la diana son los dos objetivos de la edición génica. Investigaciones anteriores han revelado mutaciones fuera de la diana provocadas por tecnologías de edición génica, incluyendo, sin limitación, CRISPR y TALEN, véase, por ejemplo, Tsai *et al.*, *Nature Biotechnology* 33, 187-197 (2015); Wang *et al.*, *Nature Biotechnology* 33, 175-178 (2015); Wu, W. H. *et al.* *CRISPR repair reveals causative mutation in a preclinical model of retinitis pigmentosa. Mol. Ther.* 24, 1388-1394 (2016). Para la edición génica utilizada *in vivo*, o en terapia celular (por ejemplo, *in vitro* primero en las células y después trasplantando las células *in vivo*), el segundo objetivo, evitar o minimizar la edición fuera de la diana es tan importante como lograr la corrección génica específica porque la edición fuera de la diana puede provocar enfermedades o inducir la formación de tumores. Cabe señalar que no todas las ediciones fuera de la diana pueden predecirse mediante un software o algoritmo informático.

Por lo tanto, se emplearon un diseño cuidadoso, validación y mejoras en el desarrollo y la validación de las construcciones de corrección génica por CRISPR de la mutación de CYP4V2:

(1) Se generaron múltiples candidatos de ARNg basándose en la secuencia de ácido nucleico de CYP4V2 mutante que contiene la mutación c.802-8_810del17insGC

(2) Se seleccionaron los 5 ARNg principales usando los siguientes criterios (Véanse las SEQ ID NO: 48-52, la Tabla 5 y la Figura 12):

- a. La proximidad del sitio de escisión del ARNg al sitio de modificación, y
- b. El perfil fuera de la diana del ARNg;

(3) La actividad de los 5 ARNg principales se validó en el ADN genómico de un paciente con BCD con mutaciones c.802-8_810del17insGC homocigóticas (Véase la Figura 13);

(4) Basándose en (2) y (3), se seleccionaron tres ARNg. Cada uno de los 3 ARNg se clonó en un plásmido pX459 junto con secuencias de ácido nucleico que codifican Cas9 y el gen de resistencia a puromicina (Puro) para la selección de células transfectadas usando puromicina (Véanse las Figuras 15 y 18).

(5) Se generaron dos moldes donantes (tanto complementarios directos como inversos) que proporcionaban la secuencia de ácido nucleico donante de HDR. Los ssODN que contenían las secuencias molde donantes se sintetizaron mediante IDT (Véanse las SEQ ID NO: 56 y 57).

(6) Además de las construcciones de plásmidos, se desarrolló una construcción de RNP de CRISPR. Una construcción de RNP ofrece ciertas ventajas sobre otras construcciones. A continuación y en la sección de Ejemplos se proporciona un análisis detallado.

(7) Las construcciones de corrección por CRISPR de CYP4V2 se validan en células iPS derivadas de un paciente con BCD con mutaciones c.802-8_810del17insGC homocigóticas.

(8) La secuenciación del genoma completo se realiza en células no modificadas y células iPS reparadas genéticamente mediante construcciones de corrección por CRISPR de la mutación de CYP4V2 para confirmar la corrección de la mutación c.802-8_810del17insGC y evaluar ediciones fuera de la diana.

Se proporcionan métodos para determinar las condiciones óptimas para la transfección en iPSC y para seleccionar células transfectadas. Véase la sección de Ejemplos para obtener una descripción detallada. Se contempla que estas construcciones puedan usarse en el tratamiento no solo de células iPS específicas de paciente con BCD *in vitro*, sino también de las células de origen (por ejemplo, fibroblastos o PBMC) o células iPS-RPE, iPS-PRC, iPS-CE o iPS-CEC u otras células oculares derivadas de células iPS específicas de paciente con BCD *in vitro*, así como *in vivo* en pacientes con la mutación c.802-8_810del17insGC. Los componentes de las construcciones pueden usarse directamente. Los componentes de la construcción se pueden modificar o clonar en un vector diferente para lograr una mayor eficiencia de transducción *in vivo* o mayor especificidad para el tipo de célula diana o para lograr otros fines. Por ejemplo, la Cas9 se puede modificar a Cas9 nickasa (Cas9n D10A), que contiene una mutación que permite a la endonucleasa crear mellas monocatenarias, a diferencia de las roturas bicatenarias. Emparejar dos secuencias de ARNg opuestas con la SpCas9 nickasa es un método eficaz de edición génica que evita la formación de indels no deseados. Además de los plásmidos, otros vectores comunes utilizados para empaquetar componentes de CRISPR incluyen vectores de lentivirus y vectores de virus adenoasociados (AAV). Cuando se usan vectores de AAV, el ortólogo de Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9) puede usarse como endonucleasa porque SaCas9 es aproximadamente 1 kb más corta que SpCas9 y ofrece flexibilidad adicional en torno a las limitaciones de empaquetamiento de AAV.

Se realizaron diversas mejoras en la construcción de RNP de CRISPR. En lugar de ARNgu de IVT o un dúplex ARNcr:ARNtracr, se usó un ARNgu sintético. Los ARNg sintéticos tienen mayor pureza que los ARNgu de IVT y, por lo tanto, reducen el riesgo de edición fuera de la diana provocada por impurezas en el ARNgu. Asimismo, se aplica una modificación química al ARNgu para proteger el ARNgu de la degradación intracelular, lo que puede aumentar la eficiencia de edición. Véase la sección de Ejemplos para obtener más detalles.

Se contempla que, además de las construcciones de plásmidos y las construcciones de RNP de CRISPR descritas en el presente documento, también puede usarse una construcción de ARNm que comprende un ARNm que codifica Cas9 y un oligonucleótido de ARN guía.

Después de transfectar células iPS específicas de paciente con BCD con las construcciones de corrección por CRISPR de la mutación de CYP4V2, las células transfectadas se seleccionan usando puromicina. Debe entenderse que otros marcadores, tales como GFP, puede incorporarse a las construcciones y usarse como marcador en lugar de o además de la puromicina. Después de la selección, se realiza la clonación unicelular, después de lo cual se recogen algunas células de clon unicelular para su secuenciación. Después de que los resultados de la secuenciación confirmen la edición génica exitosa en la diana y no se encuentren ediciones génicas que provoquen enfermedades, las células restantes del mismo clon se usan para la diferenciación en el tipo de célula ocular deseado, por ejemplo, células iPS-RPE.

D. Diferenciación de iPSC

Las células iPS del paciente con BCD reparadas genéticamente se diferencian en células iPS-RPE (u otro tipo de células oculares (por ejemplo, células iPS-CEC, iPS-CE o iPS-PRC). Se conocen métodos para diferenciar iPS en células RPE u otro tipo de célula ocular (por ejemplo, CEC y PRC). Véase, por ejemplo, Hayashi *et al.*, 2012, *PLoS One*, 7(9):e45435; Songstad, *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* Diciembre de 2015, Vol. 56, 8258-8267; y Lamba *et al.*, *PLoS One*. 20 de enero de 2010; 5(1):e8763. Por ejemplo, las células madre pluripotentes inducidas (iPS) reprogramadas a partir de células se pueden producir y diferenciar adicionalmente en, por ejemplo, células RPE (denominadas en el presente documento "iPS-RPE"), células epiteliales corneales (denominadas en el presente documento "iPS-CEC"), células fotorreceptoras (o progenitores de fotorreceptores; denominadas en el presente documento "iPS-PRC") o células iPS-endoteliales coroides (CE) (denominadas "iPS-CE").

Las células diferenciadas, por ejemplo, células iPS-RPE, se someten a ensayo en cuanto a sus funciones bioquímicas (como se describe en la sección de Ejemplos) para confirmar que tienen funciones bioquímicas mejoradas en comparación con las células iPS-RPE del paciente sin reparación genética.

Las estirpes celulares iPS-RPE producidas como se describe en el presente documento presentan la morfología (por ejemplo, pigmentación y forma hexagonal) y/o expresan uno o más biomarcadores que son indicativos de células RPE. Se conocen biomarcadores para células RPE (y células iPS-RPE) e incluyen, sin limitación, uno o más de RLBP1 (también conocido como CRALBP), RPE65, BESTROFINA-1, MITF, VINCULINA, LRAT, RDH5, PAX6, MERTK, TYR y/o ZO-1, y pueden usarse para determinar o confirmar que se ha producido la diferenciación del RPE. De forma similar, se conocen biomarcadores para CEC (e iPS-CEC) y PRC (e iPS-PRC) e incluyen, por ejemplo, citoqueratina 12 y citoqueratina 3 para las células epiteliales corneales; y Crx para fotorreceptores, recoverina para bastones y conos, y Nrl para bastones.

E. Administración / Suministro

Las células iPS-RPE reparadas genéticamente pueden usarse en trasplantes autólogos al paciente del que derivan las células iPS-RPE. Los pacientes con BCD u otra afección oftalmológica debido a mutaciones de CYP4V2 pueden ser tratados mediante los métodos de terapia celular proporcionados en el presente documento. De forma similar, el método puede usarse para proporcionar una terapia celular autóloga reparada genéticamente para otras enfermedades oculares provocadas por una o más mutaciones genéticas.

Se conocen métodos de administración o suministro de células al ojo. Véase, por ejemplo, Wert *et al.*, *J Vis Exp*. 2012; (69): 4286; el documento WO 2016/179496; Schwartz *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* Abril de 2016, Vol. 57, ORSFc1-ORSFc9. En una realización, la célula ocular se puede trasplantar a través de inyección de suspensión celular, por ejemplo, suspensión de células RPE. En otra realización, las células se pueden trasplantar como parte de una lámina o armazón, por ejemplo, un tejido *in vitro* usando armazones naturales y/o sintéticos para generar una monocapa de RPE funcional polarizada.

Los expertos en la materia conocen la cantidad terapéuticamente eficaz de células administradas al ojo y variará con el tipo de células que se trasplantan, la madurez de las células que se trasplantan y si se espera que se dividan después del trasplante, el tamaño del área o el número de células diana de reemplazo y el sujeto que se está tratando (por ejemplo, la edad, el sexo, el peso, la fase de desarrollo de la enfermedad y el estado del sujeto que se ha de tratar); la vía de administración; y la pauta necesaria. La cantidad terapéuticamente eficaz de células utilizadas en la terapia con células oculares puede variar de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^8 células en una única administración.

Aunque se pueden generar estirpes celulares iPS para sujetos individuales, se puede generar un banco de células de iPS que tengan haplotipos HLA comunes (o en las que el haplotipo HLA se ha manipulado genéticamente), que se diseñaría para conseguir compatibilidad inmunitaria con una gran parte de la población de pacientes. Véase, por ejemplo, Turner *et al.*, *Cell Stem Cell*, 13:382-384, 2013. Asimismo, se puede generar una estirpe celular iPS que sea inmunitariamente silenciosa independientemente del genotipo del sujeto (véase, por ejemplo, Riobobos *et al.*, *Mol. Ther.*, 21:1232-41, 2013). Cuando se combinan con estos métodos, las células iPS específicas de paciente y las células iPS oculares pueden usarse no solo en un sentido estrictamente autólogo, sino que también puede usarse para trasplantes a otros pacientes.

Normalmente, la etapa de administración de la terapia celular tiene lugar después de la aparición de los síntomas de la enfermedad o después de que el sujeto haya mostrado signos de degeneración retiniana o distrofia corneal, según corresponda. En una realización, la terapia con células oculares proporcionada en el presente documento puede usarse independientemente en el tratamiento de una enfermedad ocular (por ejemplo, BCD). En otra realización, la terapia con células oculares proporcionada en el presente documento puede usarse en combinación con una o más opciones de tratamiento, incluyendo, sin limitación, la terapia de transferencia génica de CYP4V2 y/o la terapia de edición génica por CRISPR de CYP4V2 proporcionadas en el presente documento.

De forma similar, la administración puede producirse una vez o varias veces (por ejemplo, durante varias semanas, meses o años) y puede aplicarse en el mismo ojo o en el ojo contralateral. Además, pueden administrarse uno o

más tipos celulares en administraciones únicas o separadas.

La evaluación posterior al tratamiento puede usar los métodos descritos en la sección Terapia génica con CYP4V2 del presente documento, incluyendo, sin limitación, a través de exámenes de la vista tales como la función visual, por ejemplo, medidos mediante la agudeza visual, el campo visual, la adaptación a la oscuridad, la función visual y/o Tomografía de Coherencia Óptica (OCT, por sus siglas en inglés, por ejemplo, Dominio espectral-OCT (SD-OCT)) y ERG.

Métodos de uso de RNP de CRISPR en terapia con células oculares y terapia génica

RNP de CRISPR es un complejo de ribonucleoproteína (RNP) de edición génica que incluye un ARN guía complejo con una proteína Cas (por ejemplo, proteína Cas9). El ARN guía se compone de dos ARN denominados ARN de CRISPR (ARNcr) y ARNcr transactivador (ARNtracr). El ARNcr y el ARNtracr pueden proporcionarse como dos moléculas de ácido nucleico separadas. Como alternativa, el ARNcr y el ARNtracr se pueden combinar en un ARN guía único quimérico (ARNgu). Los ARNgu pueden tener aproximadamente 100 nucleótidos (nt) de longitud, o ser más cortos o más largos, según se desee o sea necesario. Se hibridan veinte nt en el extremo 5' (ARNcr) con una secuencia de ADN diana mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick y guían a la endonucleasa Cas para escindir el ADN genómico diana, con la estructura bicatenaria restante en el lado 3' para el reconocimiento de Cas9.

Las RNP de CRISPR tienen ventajas y desventajas en comparación con las construcciones tradicionales de Cas9/ARNg (por ejemplo, construcciones de plásmidos que incorporan secuencias de ácido nucleico, el ARN guía de CRISPR y la proteína Cas9). Por ejemplo, el ARN guía (ARNcr y ARNtracr) y la proteína Cas9 se pueden suministrar a las células diana como complejos intactos, superando la necesidad de que la propia maquinaria de transcripción de la célula exprese los componentes de CRISPR. Como resultado, las RNP de CRISPR pueden editar rápidamente después de la transfección. Asimismo, los componentes de CRISPR se agotan más rápido de las células, lo que puede reducir la posibilidad de edición fuera de la diana. Además, puede reducir la posibilidad de mutagénesis integracional provocada por plásmidos. Dadas estas ventajas, la RNP también puede ser ventajosa en la edición génica *in vivo*. Por otra parte, sin embargo, ya que RNP se elimina rápidamente de las células a través de la degradación de proteínas, puede tener una menor eficiencia de edición en la diana que las construcciones de plásmidos cuya expresión dura más en las células.

Evaluar la hipótesis anterior y demostrar si las construcciones de RNP de CRISPR pueden lograr ambos objetivos de la edición génica deseada en la terapia con células oculares y la terapia génica, se diseñaron dos conjuntos de construcciones. Una construcción es una construcción de plásmido y la otra es una construcción de RNP. Ambas construcciones usan las mismas células iPS del paciente con BCD para la transfección, que posteriormente se secuencian para analizar la reparación genética en la diana y la edición fuera de la diana de cada construcción. La edición fuera de la diana se determina comparándola con el ADN genómico de fibroblastos no modificados del mismo paciente. Se pueden comparar los resultados tanto de la construcción de plásmido como de la construcción de RNP.

En la sección de Ejemplos se proporciona una descripción detallada de RNP, métodos para formar RNP y para usar la construcción de RNP para generar células reparadas genéticamente (células iPS e iPS-RPE) para un paciente con BCD.

Cabe señalar que puede usarse una construcción de RNP de CRISPR similar para corregir o inactivar otras mutaciones de BCD y mutaciones de otras RP e IRD. En un aspecto, la secuencia de ARNcr utilizada en el presente documento se cambia por otra secuencia de ARNcr que se dirige específicamente a una secuencia de mutación diana diferente. En otro aspecto, se puede modificar un ARN guía o un ARNgu en una construcción de RNP para potenciar la eficiencia de la edición génica. Véase, Hendel *et al.*, *Nat Biotechnol.* Septiembre de 2015; 33(9): 985-989. Las construcciones de RNP de CRISPR se pueden transfectar mediante electroporación. La construcción de RNP de CRISPR se puede transfectar usando lipofección o nucleofección. La construcción de RNP de CRISPR se puede suministrar mediante microinyección.

Además de reparar y tratar genéticamente las células de los pacientes *in vitro*, las construcciones de RNP de CRISPR también pueden usarse para tratar una enfermedad ocular provocada por mutaciones genéticas *in vivo* y tienen ventajas sobre otros tipos de construcciones de CRISPR (por ejemplo, plásmidos y/o ARNm que codifican los componentes de CRISPR) para aplicaciones *in vivo*. Por ejemplo, las construcciones de RNP de CRISPR tienen mayor potencia, menor riesgo fuera de la diana y/o menor toxicidad o activación de la respuesta inmunitaria innata en comparación con ARNm y ARNgu de Cas9 transcritos *in vitro*. Se pueden inyectar construcciones de RNP de CRISPR compuestas por una proteína Cas9 complejada con un ARN guía dirigido a la región de la secuencia de ADN mutante directamente en el ojo del sujeto (por ejemplo, inyección subretiniana, inyección intravítrea o en la córnea). Pueden usarse variantes modificadas de Cas9 con múltiples secuencias de localización nuclear (NLS) de SV40 que han mostrado una mayor eficiencia de edición en células cerebrales *in vivo* (Staahl *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2017 May;35(5):431-434) para lograr una mayor eficiencia de edición en células oculares. La proteína Cas9 con una o múltiples NLS (en el extremo N y/o extremo C) está disponible en el mercado en varias CRO, tales como

IDT y Feldan. La construcción de RNP de CRISPR se puede suministrar "tal cual". La construcción de RNP de CRISPR se puede formular con un portador farmacéuticamente aceptable cuando se suministra. La construcción de RNP de CRISPR se puede suministrar en forma empaquetada, por ejemplo, en una nanopartícula.

Se entenderá que la relación entre los componentes de RNP de CRISPR, por ejemplo, el ARN guía y la proteína Cas9, se pueden ajustar y optimizar sometiendo a ensayo diferentes relaciones en estirpes celulares de pacientes *in vitro* (por ejemplo, células iPS específicas de paciente con BCD o células iPS-RPE) antes del tratamiento *in vitro* o *in vivo*. La construcción de RNP de CRISPR puede usarse independientemente o en combinación con otra construcción de CRISPR, incluyendo, sin limitación, un plásmido o vector que codifica un ARN guía de CRISPR o ARNcr, o una proteína Cas o una combinación de los mismos; un ARNm que codifica Cas9; un oligonucleótido de ARN guía; otra construcción de RNP de CRISPR; o una combinación o híbrido de los mismos. Asimismo, las construcciones de RNP de CRISPR pueden usarse para corregir o inactivar una o más de una mutaciones relacionadas con una o más de una enfermedad ocular.

Tratamiento de combinación de terapia génica y terapia celular

La divulgación del presente documento proporciona múltiples opciones de tratamiento para la BCD y otras enfermedades oculares provocadas por mutaciones de CYP4V2, incluyendo, sin limitación, la terapia de transferencia génica de CYP4V2 y la terapia de edición génica por CRISPR de CYP4V2. Tanto la terapia de transferencia génica de CYP4V2 como la terapia de edición génica de CYP4V2 pueden usarse *in vivo* o *in vitro* o tanto *in vivo* como *in vitro*. Cuando se aplica *in vivo*, la terapia de transferencia génica de CYP4V2 y/o la terapia de edición génica por CRISPR de CYP4V2 pueden tratar las células oculares restantes afectadas por BCD como terapia génica. Cuando se aplica *in vitro* en células de pacientes o células derivadas de pacientes, las células tratadas mediante terapia de transferencia génica de CYP4V2 y/o mediante terapia de edición génica por CRISPR de CYP4V2 se pueden trasplantar al paciente para reemplazar las células oculares muertas o degeneradas como terapia celular. De manera significativa, las composiciones y métodos de terapia génica y terapia celular proporcionados en el presente documento se pueden combinar para proporcionar beneficios adicionales a los pacientes que no se pueden lograr usando terapia génica o terapia celular solas. El "tratamiento de combinación" también puede ampliar la base de pacientes elegibles. Por ejemplo, para pacientes en fase avanzada a quienes les quedan pocos o ningún fotorreceptor o células RPE, la terapia génica no es tan eficaz como para los pacientes en fase temprana. En este caso, la terapia celular los puede beneficiar proporcionando células nuevas (por ejemplo, células RPE o fotorreceptoras), mientras que la terapia génica puede mejorar el efecto de la terapia celular rescatando las células RPE o fotorreceptoras restantes y/o mejorando las condiciones de las células coroides cuya salud afecta a las condiciones de las células oculares. La combinación del efecto de "rescate" y "reemplazo" de la terapia génica y la terapia celular, respectivamente, hace que el tratamiento de combinación sea una mejora con respecto a la terapia génica o la terapia celular. Este método de tratamiento de combinación puede aplicarse a otras enfermedades oculares provocadas por una o más mutaciones genéticas.

Métodos y composiciones para la terapia génica con CYP4V2

La presente divulgación se refiere a diversas composiciones que incluyen un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína CYP4V2 no mutante o funcional o una variante funcional de la misma que tiene al menos un 96 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 4-6 y 19-29 y diversos métodos que utilizan las mismas para tratar una célula ocular y/o una enfermedad ocular. En algunas realizaciones, se usa un casete de expresión que comprende dicha molécula de ácido nucleico que codifica una proteína CYP4V2 funcional unida operativamente con una o más secuencias reguladoras para dirigir y controlar la expresión del producto de la molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, se usa un vector para empaquetar dicho casete de expresión de CYP4V2 que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína CYP4V2 funcional y una o más secuencias reguladoras para potenciar el suministro a la célula diana y lograr la expresión deseada del producto de dicha molécula de ácido nucleico que codifica CYP4V2 y casete de expresión.

El vector es un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV). En algunas realizaciones, el vector es un plásmido. En algunas realizaciones, los vectores son para su uso en métodos de tratamiento que comprenden administrar o suministrar una cantidad eficaz (o una concentración eficaz) de dichos vectores al ojo del sujeto y/o las células diana. En una realización, el tratamiento se aplica directamente *in vivo*. En otra realización, el tratamiento comprende el tratamiento *ex vivo* en células diana (por ejemplo, una célula ocular) y trasplantar las células diana tratadas al sujeto (por ejemplo, al ojo del sujeto). El tratamiento se dirige a enfermedades oculares y otras afecciones asociadas a mutaciones de CYP4V2. En una realización, la enfermedad ocular es la distrofia del cristalino de Bietti (BCD).

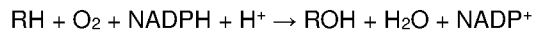
A. Proteína CYP4V2 funcional y ácidos nucleicos que codifican una proteína CYP4V2 funcional

El CYP4V2 (citocromo P450, Familia 4, Subfamilia V, Polipéptido 2, (MIM 608614), sinónimo: CYP4AH1) es una de las proteínas en la superfamilia del citocromo P450 (P450) y un miembro de la subfamilia 4 del citocromo P450 (CYP4). Los citocromos P450 (CYP) son proteínas importantes que contienen hemo, conocidas por su función como enzimas oxidasas. El término P450 deriva del pico espectrofotométrico en la longitud de onda del máximo

de absorción de la enzima (450 nm) cuando está en estado reducido y complejada con monóxido de carbono. Están implicados en el metabolismo de xenobióticos y compuestos endógenos, tales como lípidos y ácidos grasos. Las enzimas CYP se han identificado en todos los reinos de la vida: animales, plantas, hongos, protistas, bacterias, arqueas e incluso en virus. Sin embargo, no son omnipresentes; por ejemplo, no se han encontrado en *Escherichia coli*.

Las proteínas P450 comparten elementos clave en la estructura. Por ejemplo, las proteínas P450 pueden identificarse por su elemento de secuencia característico FXXGXXXCXG (SEQ ID NO: 30), donde la cisteína sirve como ligando axial para el hierro hemo. La identidad de secuencia es relativamente baja entre las proteínas P450, pero su topografía general y su plegamiento estructural están altamente conservados. El núcleo conservado está compuesto por una espiral denominada "meandro", un haz de cuatro hélices, hélices J y K, y dos conjuntos de láminas beta. Estos constituyen el bucle de unión del hemo (con una cisteína absolutamente conservada que sirve como 5.^º ligando para el hierro del hemo), el surco de transferencia de protones y el motivo EXXR conservado (SEQ ID NO: 31) en la hélice K. Las proteínas P450 son principalmente proteínas asociadas a membrana ubicadas en la membrana interna de las mitocondrias o en el retículo endoplásmico de las células.

Además de las similitudes estructurales, las proteínas P450 también comparten similitudes funcionales. La reacción más común catalizada por las enzimas P450 es una reacción de monooxigenasa, por ejemplo, inserción de un átomo de oxígeno en la posición alifática de un sustrato orgánico (RH) mientras el otro átomo de oxígeno se reduce a agua:



Muchas reacciones de hidroxilación (inserción de grupos hidroxilo) usan enzimas P450. Muchas enzimas P450 tienen esteroides y/o ácidos grasos como sustratos.

La proteína CYP4V2 humana (Sec de Ref de NCBI: NP_997235.3) tiene 525 aminoácidos (secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4). Existen variantes de la proteína CYP4V2 humana, incluyendo variantes patológicas (es decir, mutaciones) (Véase la Tabla 1 del presente documento para obtener una lista selecta de mutaciones de CYP4V2 entre pacientes con BCD) y variantes no patológicas (es decir, funcionales).

En un aspecto, una proteína CYP4V2 funcional es la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4). En otros aspectos, una proteína CYP4V2 funcional es un fragmento o variante funcional de la proteína CYP4V2 humana, incluyendo, sin limitación, uno que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 5).

Una proteína CYP4V2 funcional también puede ser una variante de otra proteína CYP4V2 funcional. El siguiente es un análisis basado en el cambio de los aminoácidos de un polipéptido descrito en el presente documento para crear una molécula de segunda generación equivalente o incluso mejorada. Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura proteica sin pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras, tales como, por ejemplo, sitios de unión en moléculas de sustrato, por ejemplo, sitio de unión para ácidos grasos. Ya que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad funcional biológica de esa proteína, se pueden realizar determinadas sustituciones de aminoácidos en una secuencia de proteínas y en su secuencia codificante de ADN o ARN subyacente y, sin embargo, producir una proteína con propiedades similares. Por lo tanto, se contempla que pueden realizarse diversos cambios en la secuencia de aminoácidos de una proteína CYP4V2 funcional o en las secuencias de ADN o ARN de genes o regiones codificantes de las mismas sin una pérdida apreciable de su utilidad o actividad biológica, como se analiza en el presente documento. Por ejemplo, la SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de una variante de la proteína CYP4V2 que tiene un cambio de aminoácido con respecto a la secuencia de la proteína CYP4V2 humana mostrada en la SEQ ID NO: 4.

Pueden usarse diversas técnicas, algoritmos, software y herramientas para diseñar o modificar derivados funcionales, variantes y/o fragmentos de una proteína CYP4V2 funcional, por ejemplo, la proteína CYP4V2 humana. Por ejemplo, la estructura y las funciones de los diversos polipéptidos o cambios pueden modelarse, resolverse o predecirse mediante RMN, cristalografía de rayos X o modelado informático, por ejemplo, ClustalW, servidor SWISS-MODEL, Swiss-Pdb Viewer, Polyphen-2, PROVEAN, SIFT, Condel, MutationAssessor y FatHMM.

Una proteína CYP4V2 funcional también puede ser un fragmento o derivar de un fragmento de una proteína CYP4V2 funcional. Por ejemplo, la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4) y su variante (SEQ ID NO: 5) tienen ambas un dominio transmembrana entre aproximadamente el resto de aminoácido 13 y aproximadamente el resto 35 del extremo N. La cadena principal de la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4) está ubicada entre aproximadamente 36-525aa. Por tanto, una CYP4V2 funcional puede derivar de la delección de los primeros aproximadamente 35 aminoácidos de la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 6) y reemplazándolos con una secuencia de dominio transmembrana alternativa. Otra fuente de una proteína CYP4V2 funcional es una variante de corte y empalme de una proteína CYP4V2 funcional.

El segmento transmembrana predicho de CYP4V2 reside cerca del extremo N, seguido de un dominio estructural

globular típico de la familia CYP450. El dominio globular de CYP4V2 incluye 18 hélices y segmentos estructurales beta. El grupo hemo se ubica cerca de la superficie de la proteína, coordinado por la hélice I hacia el interior de la proteína y la hélice L superficialmente. Li *et al.*, *Am J Hum Genet.* 74:817-826, 2004. La proteína CYP4V2 es predominantemente activa en el metabolismo de los ácidos grasos. Muchas otras enzimas P450 también participan en el metabolismo de los ácidos grasos. CYP4V2 se expresa de forma ubicua en casi todos los tejidos y órganos. Se encontró expresión de CYP4V2 en el corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, retina, epitelio pigmentario retiniano, córnea y linfocitos (Li *et al.*, *Am J Hum Genet.* 74:817-826, 2004). Sin embargo, la mayoría de las demás enzimas P450 no están presentes en las células oculares. Por ejemplo, CYP4V2 y CYP1B1 fueron las únicas enzimas P450 expresadas a niveles elevados en la estirpe celular ARPE-19; CYP2E1, CYP2J2 y CYP3A4 se transcribieron solo a niveles bajos (5 % de la expresión de ARNm de CYP4V2) y los transcritos de CYP4A11, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3 y CYP4F12 no fueron detectables (Nakano, *et al.*, *Mol Pharmacol* 2012; 82: 679-686). El hecho de que los síntomas de las mutaciones de CYP4V2 se limiten al ojo, donde CYP4V2 es la única enzima P450 importante expresada además de CYP1B1 y la única enzima P450 de la subfamilia 4 (CYP4) expresada, pero no se muestren en órganos donde CYP4V2 está presente con otras enzimas P450, sugiere que pueden usarse otras enzimas P450, particularmente enzimas CYP4, para sustituir total o parcialmente las funciones de CYP4V2. De hecho, se ha descubierto que la subfamilia CYP4 comparte funciones comunes en el metabolismo de los ácidos grasos, incluyendo, sin limitación, como hidroxilasa para AGPI. Véase, Hardwick, *Biochem. Pharmacol.*, 75(12):2263-75; Fer *et al.*, *J. Lipid Res.*, 49(11):2379-89; Nakano *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 2012, 82:679-686). Las secuencias de proteína de las proteínas CYP4 humanas se muestran en las SEQ ID NO: 8-18.

Además de compartir sustratos y funciones con las otras proteínas de la subfamilia CYP4, el análisis computacional reveló que CYP4V2 se formó a partir de la duplicación de los ancestros de CYP46A (SEQ ID NO: 7), que después se duplicó para generar toda la familia CYP4. Pan *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, 17(7) pii: E1020. doi: 10.3390/ijms17071020.

Además, el gen CYP4V2 (u ortólogos del gen CYP4V2, por ejemplo, Cyp4v3 para ratón) se conserva en muchas especies, incluyendo, sin limitación, ser humano, chimpancé, macaco de la India, perro, vaca, ratón, rata, pollo, rana, caballo, conejo y mosca de la fruta (SEQ ID NO: 19-29). Se han encontrado ortólogos con el gen humano CYP4V2 en 196 organismos.

Una proteína CYP4V2 funcional puede comprender o diseñarse a partir de, modificarse a partir de o derivar de, incluyendo, sin limitación, los siguientes:

- (i) la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4)
- (ii) una variante de (por ejemplo, cambio de los aminoácidos y/o una variante de corte y empalme) de la proteína CYP4V2 humana o una proteína CYP4V2 funcional (por ejemplo, SEQ ID NO: 5),
- (iii) uno o más fragmentos de una proteína CYP4V2 funcional (por ejemplo, SEQ ID NO: 6),
- (iv) una proteína CYP4V2 (u ortóloga) de otras especies,
- (v) otra proteína CYP4 o CYP46A1,
- (vi) un polipéptido que puede mejorar, tratar o detener una o más anomalías bioquímicas en uno o más compuestos enumerados en la Tabla 2 en una célula de un paciente (por ejemplo, la célula iPS-RPE de un paciente con BCD), y/o
- (vii) un derivado, híbrido o variante de uno cualquiera o más de los puntos (i) a (vi) anteriores.

Se contempla que las composiciones y métodos divulgados en el presente documento pueden usarse para expresar cualquier proteína CYP4V2 funcional como se ha descrito anteriormente. En una realización, una proteína CYP4V2 funcional es un polipéptido que tiene al menos un 96 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 4, 5 o 6. En algunos ejemplos que no forman parte de la invención reivindicada, una proteína CYP4V2 funcional es un polipéptido que comprende todo o parte de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en CYP4V2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1 y CYP46A (SEQ ID NO: 7-18). En algunas realizaciones, una proteína CYP4V2 funcional es un polipéptido que tiene al menos un 96 % de identidad de secuencia con cualquiera de CYP4V2 de chimpancé, macaco de la India, perro, vaca, ratón, rata, pollo, rana, caballo, conejo y mosca de la fruta (SEQ ID NO: 19-29). En algunas realizaciones, una proteína CYP4V2 funcional puede tener al menos un 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias seleccionadas del grupo de las SEQ ID NO: 4-6 y 19-29. En un ejemplo que no forma parte de la invención reivindicada, una proteína CYP4V2 funcional es un polipéptido que comprende elementos de secuencia de FxxGxxxG y ExxR (SEQ ID NO: 30 y 31).

En algunas realizaciones, una proteína CYP4V2 funcional es un compuesto o agente que puede mejorar, tratar o detener una o más anomalías bioquímicas en una célula de un paciente (por ejemplo, la célula iPS-RPE de un paciente con BCD).

En una realización, el vector que incluye una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína CYP4V2 no mutante o funcional o una variante funcional de la misma que tiene al menos un 96 % de identidad de secuencia

con cualquiera de las SEQ ID NO: 4-6 y 19-29 se usa para expresar la proteína CYP4V2 funcional en las células diana. En una realización, la molécula de ácido nucleico es un ARN. En otra realización, la molécula de ácido nucleico es un ADN, incluyendo, sin limitación, un ADN complementario (ADNc), para la expresión a largo plazo. El ADNc puede ser de sentido positivo o negativo, mono o bicatenario. En algunas realizaciones, el ácido nucleico que codifica una proteína CYP4V2 funcional está unido operativamente con una o más secuencias reguladoras para formar un casete de expresión de CYP4V2. En algunas realizaciones, dicho casete de expresión está empaquetado en el vector para un suministro y/o una eficiencia de expresión potenciados.

Un codón consiste en un conjunto de tres nucleótidos y codifica un aminoácido específico o da como resultado la terminación de la traducción (es decir, codones de parada). La gran mayoría de los aminoácidos (por lo general todos menos la metionina) están codificados por múltiples codones. Por lo tanto, pueden usarse diferentes secuencias de ácidos nucleicos para expresar la misma proteína. La identidad de secuencia entre dos moléculas de ácido nucleico que codifican la misma secuencia de proteína puede variar del 0 % a más del 99 %. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 1) y otra secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 2), que codifican ambas la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4), solo comparten una identidad de secuencia del 77 %.

La optimización de codones de secuencias de ácidos nucleicos puede mejorar y/o estabilizar la expresión de proteínas sin cambiar la secuencia de aminoácidos codificada. La optimización de codones reemplaza los codones presentes en una secuencia de ácido nucleico con codones preferidos que codifican el mismo aminoácido, por ejemplo, codones preferidos para la expresión en mamíferos. Pueden usarse diversas estrategias y parámetros en la optimización de codones, incluyendo, sin limitación, sesgo de uso de codones, contenido de GC, contenido de dinucleótidos CpG, estructura secundaria de ARNm, sitios de corte y empalme crípticos, sitios de PolIA prematuros, sitios chi y sitios de unión ribosómica internos, islas CpG negativas, motivo de inestabilidad de ARN (ARE), secuencias repetitivas (repetición directa, repetición inversa y repetición Dyad) y sitios de restricción que pueden interferir con la clonación. En la técnica se conocen métodos de optimización de codones, por ejemplo, la patentes de los EE. UU. n.º 6.114.148 y el documento US 20110081708. Puede generarse una secuencia de ácido nucleico con codones optimizados de una secuencia de aminoácidos determinada o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido mediante los métodos descritos en el presente documento y/o usando diversos programas informáticos de optimización de codones, incluso a través de software en línea.

Se apreciará que, dependiendo de los métodos de optimización de codones, la configuración, los algoritmos o el software utilizados, pueden generarse diferentes secuencias de ácido nucleico con codones optimizados que codifican la misma proteína. Sin embargo, la optimización de codones no siempre conduce a una expresión mejorada en comparación con una secuencia de ácido nucleico no modificada de tipo silvestre. Véase Alexeyev MF, Winkler HH: *Gene synthesis, bacterial expression and purification of the Rickettsia prowazekii ATP/ADP translocase. Biochim Biophys Acta*. 1999, 1419: 299-306. 10.1016/S0005-2736(99)00078-4; Curran KA, Leavitt JM, Karim AS, Alper HS: *Metabolic engineering of muconic acid production in Saccharomyces cerevisiae. Metab Eng*. 2013, 15: 55-66; Agashe D, Martínez-Gómez NC, Drummond DA, Marx CJ: *Good codons, Bad transcript: large reductions in gene expression and fitness arising from synonymous mutations in a Key enzyme. Mol Biol Evol*. 2013, 30 (3): 549-560. 10.1093/molbev/mss273. doi:10.1093/molbev/mss273.

En el presente documento se proporciona una secuencia de ácido nucleico con codones optimizados (SEQ ID NO: 2) que codifica la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4). Tanto SEQ ID NO: 1 como SEQ ID NO: 2 codifican la misma proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4). La secuencia de ácido nucleico con codones optimizados (SEQ ID NO: 2) tiene un índice de adaptación de codones (CAI) mejorado de 0,95 sobre un CAI de 0,94 para la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 1. Un CAI de 1,0 se considera perfecto en el organismo de expresión deseado. Se entenderá que la presente divulgación cubre todas las formas y tipos de la secuencia de ácido nucleico con codones optimizados representada por la secuencia de ADNc mostrada en la SEQ ID NO: 2, incluyendo cualquier secuencia de ARN o secuencia de ADN u otra secuencia de ácido nucleico correspondiente a dicha secuencia de ADNc o derivada de la misma, y puede estar en forma monocatenaria o bicatenaria, y/o en sentido positivo, negativo, anti o complementario con respecto a la secuencia proporcionada en el presente documento.

Además de la optimización de codones, pueden usarse otros métodos para mejorar el rendimiento de la traducción. Por ejemplo, pueden usarse la secuencia Kozak o la secuencia Shine-Dalgarno para aumentar la eficiencia del inicio de la traducción. Puede usarse un codón de parada diferente (por ejemplo, TGA) para aumentar la eficiencia de la terminación de la traducción. Además de la secuencia ORF, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CYP4V2 funcional también puede incluir una o más secuencias no codificantes tales como una o más UTR y/o uno o más intrones para mejorar la expresión de proteínas. Se puede insertar una secuencia Kozak (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 36) inmediatamente antes de un ADNc que codifica CYP4V2 para potenciar la expresión.

Como se analiza en el presente documento, se contempla que pueden utilizarse variantes funcionales y/o fragmentos de la proteína CYP4V2 humana. En la SEQ ID NO: 3 se proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una variante funcional (SEQ ID NO: 5) de la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4).

En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de CYP4V2 es una molécula de polinucleótido que codifica una proteína CYP4V2 funcional que incluye cualquiera de las SEQ ID NO: 4-6 y 19-29 o que codifica una variante funcional de la misma con al menos un 96 % de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las secuencias mostradas en las SEQ ID NO: 4-6 y 19-29. En algunas realizaciones, una molécula de ácido nucleico de CYP4V2 es un polinucleótido que comparte al menos un 76 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2 o 3.

Un vector (por ejemplo, un vector vírico o no vírico) y un casete de expresión de CYP4V2 como se describe en el presente documento normalmente contienen una o más moléculas de ácido nucleico de CYP4V2 o un fragmento de las mismas. Se entenderá que una molécula de ácido nucleico puede adoptar muchas formas, incluyendo, sin limitación, ADN o ARN, ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, ADNmc, ARNmc), ácidos nucleicos bicatenarios (por ejemplo, ADNbc, ARNbc), ácidos nucleicos de cadena positiva o negativa, ADN complementarios (ADNc), ADN genómico, ARN mensajero (ARNm), ARN de interferencia pequeño (ARNip) y/o ARN de interferencia dirigido por ADN (ARNidd)). Las moléculas de ácido nucleico también pueden incluir uno o más análogos de nucleótidos o modificaciones de la cadena principal. Asimismo, se entenderá que un ADNc puede sintetizarse a partir de un molde de ARNm en una reacción catalizada por una enzima transcriptasa inversa, o puede diseñarse y sintetizarse basándose en la proteína que pretende codificar, incluyendo, sin limitación, un ADNc con codones optimizados, o puede sintetizarse a partir de otra molécula de ácido nucleico mediante mutagénesis. También se entenderá que un ADNc puede contener solo exones, o puede contener exones más otras secuencias, por ejemplo, regiones no traducidas (UTR) y/o intrones. En algunos casos, un vector y un casete de expresión de CYP4V2 descritos en el presente documento pueden incluir una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica la proteína CYP4V2 humana, o una variante funcional o un fragmento de la misma.

Una secuencia de ácido nucleico adecuada puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico que codifique una proteína CYP4V2 funcional. Dicha secuencia de ácido nucleico puede contener o no elementos no codificantes, tales como UTR, intrones o una secuencia Kozak. Puede incluir una secuencia de tipo silvestre o una secuencia sintética o modificada (por ejemplo, una secuencia con codones optimizados). Se puede generar una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CYP4V2 funcional como se describe en el presente documento o mediante otros métodos conocidos en la técnica.

Una molécula de ácido nucleico con la secuencia como se muestra en la SEQ ID NO: 1 que codifica la proteína CYP4V2 humana se denomina en el presente documento "CYP4V2st". Una molécula de ácido nucleico con una secuencia de codones optimizados como se muestra en la SEQ ID NO: 2 que codifica la proteína CYP4V2 humana se denomina en el presente documento "CYP4V2op". Una molécula de ácido nucleico con la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 que codifica una variante funcional de la proteína CYP4V2 humana se denomina en el presente documento "CYP4V2fn". En algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CYP4V2 funcional tiene una identidad de secuencia de al menos el 76 % con una de las SEQ ID NO 1, 2 o 3.

Una proteína CYP4V2 funcional y una molécula de ácido nucleico que codifica dicha proteína CYP4V2 funcional se pueden sintetizar o aislar, purificar y detectar mediante métodos conocidos en la técnica. Asimismo, la síntesis o aislamiento, purificación y detección de proteínas también están disponibles en el mercado a través de CRO, incluyendo Wuxi Aptec (Shanghai, China) y GenScript (Piscataway, Nueva Jersey). La síntesis o aislamiento, la clonación por purificación y la detección de moléculas de ácido nucleico están disponibles en el mercado a través de CRO, incluyendo GenScript (Piscataway, Nueva Jersey) y Integrated DNA Technologies (Coralville, Iowa).

Un polipéptido puede sintetizarse (por ejemplo, mediante expresión de proteínas recombinantes o síntesis química) o aislarse. Como se usa en el presente documento, un polipéptido "purificado" es un polipéptido que se ha separado o purificado de los componentes celulares que lo acompañan de forma natural. Normalmente, un polipéptido se considera "purificado" cuando está al menos un 70 % (por ejemplo, al menos un 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 99 %), en peso seco, libre de los polipéptidos y moléculas de origen natural a las que está asociado de forma natural. Puesto que un polipéptido que se sintetiza químicamente, por naturaleza, está separado de los componentes que lo acompañan de forma natural, un polipéptido sintético está "purificado".

Los polipéptidos se pueden purificar de fuentes naturales (por ejemplo, una muestra biológica) mediante métodos conocidos tales como intercambio iónico de DEAE, filtración en gel y cromatografía de hidroxipatita. También se puede purificar un polipéptido, por ejemplo, expresando un ácido nucleico en un vector de expresión. Asimismo, se puede obtener un polipéptido purificado mediante síntesis química. El grado de pureza de un polipéptido se puede medir usando cualquier método apropiado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o análisis por HPLC.

Los polipéptidos normalmente se detectan usando anticuerpos. Las técnicas para detectar polipéptidos usando anticuerpos incluyen ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Se puede generar un anticuerpo que tenga afinidad de unión específica por un polipéptido o una porción de un polipéptido usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo se puede unir a un soporte sólido tal como una placa de microtitulación usando métodos conocidos en la técnica. En presencia de un polipéptido, se forma un complejo

anticuerpo-polipéptido.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" normalmente se refiere a una molécula de ácido nucleico que está libre de secuencias que flanquean de forma natural uno o ambos extremos del ácido nucleico en el genoma del organismo del que deriva la molécula de ácido nucleico aislada (por ejemplo, un ADNc o fragmento de ADN genómico producido por PCR o digestión con endonucleasa de restricción). Una molécula de ácido nucleico aislada de este tipo generalmente se introduce en una construcción (por ejemplo, una construcción de clonación o una construcción de expresión para su uso en terapia génica), por lo general por comodidad de manipulación, para expresar una proteína, para generar una proteína de fusión, o para otros fines, incluyendo, sin limitación, para el empaquetamiento en un vector (por ejemplo, un vector vírico o no vírico).

Los ácidos nucleicos se pueden aislar usando técnicas rutinarias en la técnica. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden aislar usando cualquier método que incluya, sin limitación, tecnología de ácido nucleico recombinante, mutagénesis específica de sitio, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/u otros métodos de ingeniería genética. Se describen técnicas de PCR generales, por ejemplo, en *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Dieffenbach y Dveksler, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Las técnicas de ácido nucleico recombinante incluyen, por ejemplo, digestión y ligadura por enzimas de restricción, que pueden usarse para aislar un ácido nucleico. Se describen protocolos de mutagénesis, por ejemplo, en *In Vitro Mutagenesis Protocols*, Bramán, ed., Humana Press, 2002.

También pueden sintetizarse ácidos nucleicos aislados químicamente, ya sea como una única molécula de ácido nucleico o como una serie de oligonucleótidos.

En la técnica se conocen construcciones que contienen un ácido nucleico. Las construcciones, incluyendo las construcciones de clonación y expresión, pueden fabricarse en el mercado a medida o mediante técnicas de ADN recombinante habituales en la técnica. Una construcción puede tener secuencias reguladoras unidas operativamente a un ácido nucleico que se va a expresar y además puede incluir secuencias tales como las que codifican un marcador seleccionable (por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos). Se analizan secuencias reguladoras en el presente documento. Una construcción que contiene un ácido nucleico puede codificar un polipéptido quimérico o de fusión (es decir, un polipéptido unido operativamente a un polipéptido heterólogo, que puede estar en el extremo N o en el extremo C del polipéptido). Son polipéptidos heterólogos representativos aquellos que pueden usarse en la purificación o detección del polipéptido codificado (por ejemplo, el marcador 6xHis, glutatión S-transferasa (GST), CFP, Fc, FLAG, HA, Myc, RFP, Strep, VSV, GFP y YFP).

Pueden introducirse construcciones que portan una secuencia de ácido nucleico en una célula hospedadora. Como se usa en el presente documento, "célula hospedadora" se refiere a la célula particular en la que se introduce el ácido nucleico y también incluye la progenie de una célula de este tipo que porta la construcción. Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, las células hospedadoras pueden ser células bacterianas tales como *E. coli*, o células de insectos, levaduras o células de mamífero (tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, células HEK293, células HeLa, Vero, V27, A549, K562, B50, WI38 y BHK). Otras células hospedadoras incluyen, sin limitación, células iPS, células ES, células RPE, células iPS-RPE, células iPS-fotorreceptoras, células ES-RPE, células ARPE-19, células de la córnea, células fotorreceptoras, células corioideas, células del nervio óptico, cualquier otro tipo de células oculares analizadas en el presente documento, células neuronales, células epiteliales, células sanguíneas, fibroblastos, linfocitos y células derivadas de células madre. Los expertos en la materia conocen muchos métodos para introducir ácidos nucleicos o un vector o un casete de expresión que porta un transgén de ácido nucleico en células hospedadoras, tanto *in vivo* como *in vitro*, e incluyen, sin limitación, electroporación, sonoporación, precipitación con fosfato de calcio, transformación con polietilenglicol (PEG), choque térmico, lipofección, microinyección y transferencia de ácido nucleico mediada por virus.

Los ácidos nucleicos se pueden detectar usando cualquier número de técnicas de amplificación (véase, por ejemplo, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, 1995, Dieffenbach y Dveksler, Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; y las patentes de los EE. UU. n.º 4.683.195; 4.683.202; 4.800.159; y 4.965.188) con un par apropiado de oligonucleótidos (por ejemplo, cebadores). Se han desarrollado varias modificaciones de la PCR original y pueden usarse para detectar un ácido nucleico. Los ácidos nucleicos también se pueden detectar usando hibridación. La hibridación entre ácidos nucleicos se analiza en detalle en Sambrook *et al.* (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Secciones 7.37-7.57, 9.47-9.57, 11.7-11.8 y 11.45-11.57). Sambrook *et al.* divulga condiciones de transferencia Southern adecuadas para sondas de oligonucleótidos de menos de aproximadamente 100 nucleótidos (Secciones 11.45-11.46) y condiciones de transferencia Southern para sondas de oligonucleótidos de más de aproximadamente 100 nucleótidos (véanse las Secciones 9.47-9.54).

B. Vectores

La molécula de ácido nucleico que codifica una proteína CYP4V2 funcional se administra a las células oculares que necesitan tratamiento por medio de un vector. Para su suministro a las células oculares, es deseable que el

vector terapéutico no sea tóxico y sea eficaz para suministrar una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN) en las células diana. Los vectores de terapia génica son conocidos en la técnica y pueden ser vectores víricos o vectores no víricos.

Un enfoque preferido para la introducción *in vivo* de ácido nucleico en una célula es mediante el uso de un vector vírico que contiene una molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un ADNc. La infección de células con un vector vírico tiene la ventaja de que una gran proporción de las células diana puede recibir la molécula de ácido nucleico. Adicionalmente, las moléculas codificadas en el vector vírico, por ejemplo, mediante un ADNc contenido en el vector vírico, se expresan eficientemente en células que han captado vectores víricos que contienen la molécula de ácido nucleico.

Los ejemplos de vectores víricos que pueden usarse incluyen, sin limitación, vectores de adenovirus, vectores de virus adenoasociados (AAV), vectores de lentivirus, vectores del virus del herpes (HV), tales como vectores del virus del herpes simple (HSV), vectores de virus del papiloma, vectores de poxvirus, vectores del virus espumoso humano (HFV), vectores del virus de Epstein Barr (VEB), vectores de virus vaccinia, vectores de virus Sendai y vectores de retrovirus. También pueden usarse plásmidos para suministrar una molécula de ácido nucleico al interior de la célula diana. En algunos casos, el vector vírico es un vector vírico recombinante tal como un vector de AAV recombinante (rAAV). Un experto en la materia entenderá que determinados vectores se integrarán, o son más propensos a integrarse, en el genoma de la célula hospedadora (por ejemplo, las células del sujeto), mientras que otros vectores no se integrarán, o son menos propensos a integrarse, en el genoma de la célula hospedadora (por ejemplo, expresión extracromosómica).

Los vectores de AAV recombinantes (rAAV) se usan habitualmente en enfoques de terapia génica. Los AAV pertenecen a la familia de los parvovirus y cada uno contiene una sola cadena de ADN. Actualmente se considera que los vectores de rAAV son la plataforma más segura y eficiente para la transferencia génica en células de mamíferos (Salganik *et al.*, 2015, *Microbiol. Spectr.*, 3(4): doi:10.1128 / microbiolspec.MDNA3-0052-2014). Hasta la fecha, se han aislado 12 serotipos de AAV (AAV1 a AAV12) y más de 100 variantes de muestras de tejido de primates humanos y no humanos (véase, por ejemplo, Gao *et al.*, 2005, *Curr. Gene Ther.*, 5:285-97) y de otras especies. En los métodos descritos en el presente documento pueden usarse tipos de AAV tanto de origen natural como modificados.

Los AAV de tipo silvestre contienen un genoma de ADN monocatenario lineal encerrado dentro de una cápside compuesta por tres proteínas VP1, VP2 y VP3. En los AAV recombinantes (rAAV), los genes rep y cap del genoma de AAV de tipo silvestre normalmente se reemplazan por un casete de expresión transgénico, flanqueado por las repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV necesarias para el empaquetamiento. Como se usa en el presente documento, "vector de rAAV" se refiere a un vector de AAV recombinante que contiene uno o más elementos de la cápside de, o derivados de, uno o más virus de AAV.

A pesar de las ventajas del AAV y otras terapias génicas mediadas por vectores víricos, no todos los vectores víricos ni todos los tipos de AAV son adecuados para tratar una enfermedad particular. La terapia génica usando vectores víricos (por ejemplo, vectores de AAV) enfrenta dos desafíos importantes. En primer lugar, es deseable una eficiencia de transducción suficiente por parte del vector de AAV en el tipo de célula diana del tratamiento. En segundo lugar, es necesario considerar las posibles reacciones inmunitarias desencadenadas por el vector vírico. Véase Madsen *et al.*, *Adeno-associated virus serotype 2 induces cell-mediated immune responses directed against multiple epitopes of the capsid protein VP1*. *J Gen Virol* 90, 2622-2633 (2009); Mingozzi *et al.*, *CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans*. *Nat Med* 13, 419-422 (2007). Aunque en comparación con la mayoría de los otros órganos y tejidos, el ojo se considera un órgano privilegiado inmunitariamente con respecto a muchos otros órganos y las respuestas inmunitarias en la terapia génica ocular mediada por AAV pueden controlarse mediante el uso de inmunosupresores, el papel de las respuestas inmunitarias tales como los anticuerpos neutralizantes (NAB) en la transducción de AAV del ojo, no está claro en animales grandes. Asimismo, la administración intravítrea de AAV es más susceptible a interacciones con el sistema inmunitario que la administración subretiniana. Por lo tanto, el vector vírico utilizado en la terapia génica ocular desencadenará una respuesta inmunitaria mínima o nula, para evitar posibles efectos secundarios y garantizar que la eficiencia de transducción/expresión de los vectores víricos no se reduzca sustancialmente por reacciones inmunitarias, por ejemplo, NAB preexistentes en el sujeto, y/o para reducir la dosis de vectores de rAAV.

Pueden usarse diversas composiciones y métodos relacionados con el diseño y la selección de vectores de AAV para abordar estos desafíos. Para el uso de la terapia génica con CYP4V2 para tratar BCD, se desea un vector con suficiente eficiencia de transducción en células RPE cuando las células diana para el tratamiento son principalmente células RPE. Cuando se tratan las células corneales de un paciente con BCD, se desea un vector con suficiente eficiencia de transducción en células corneales. En algunas realizaciones, se usa un vector de rAAV con suficiente eficiencia de transducción en células RPE. En algunas realizaciones, se usa un vector de rAAV con suficiente eficiencia de transducción en células corneales. En algunas realizaciones, se usa un vector de rAAV con suficiente eficiencia de transducción en células RPE y fotorreceptoras. En algunas realizaciones, se usa un vector de rAAV con suficiente eficiencia de transducción en células RPE, fotorreceptoras y coroides. En algunas realizaciones, se usa un vector de rAAV con suficiente eficiencia de transducción en células retinianas. En algunas

realizaciones, se usa un vector de rAAV con suficiente eficiencia de transducción en células oculares. En algunas realizaciones, se usa un vector de rAAV con suficiente eficiencia de transducción en células oculares y/o células sanguíneas. Para abordar la posible respuesta inmunitaria (por ejemplo, NAB y respuestas inmunitarias basadas en células contra los vectores de terapia génica), pueden usarse diferentes serotipos y variantes de AAV, vectores de AAV modificados y/o protocolos de inmunosupresión.

Un vector de rAAV utilizado en el presente documento puede basarse en o derivar de un AAV de tipo silvestre (por ejemplo, de uno de AAV1 a AAV12 u otras variantes de AAV de tipo silvestre aisladas de seres humanos u otras especies, incluyendo, sin limitación, AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 y AAV12) o un AAV modificado. Un AAV modificado se puede generar de muchas maneras diferentes, incluyendo, sin limitación, un AAV pseudotipado (por ejemplo, AAV2/5, AAV2/8, AAV2/1, AAV2/4, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/9, AAV2/12, AAV8/2), un AAV quimérico (por ejemplo, AAV-DJ), un AAV de cápside modificada (por ejemplo, un AAV mutante de la cápside (por ejemplo, AAV con mutaciones Y-F, K-R, T-A, S-A y/o T-V, y AAV-DJ/8 o AAV-DJ/9 que son AAV mutantes de la cápside de AAV-DJ), un AAV variante de la cápside (por ejemplo, AAV 7m8 y derivados), un AAV ancestral (por ejemplo, Anc80), un AAV recombinante que implica cualquier cambio en el genoma y/o cápside de un AAV de origen natural o variante, y cualquier combinación de los mismos. Se entenderá que existen diferentes maneras de referirse a un AAV modificado, incluyendo, sin limitación, AAV artificial, modificado, sintetizado, reconstruido, diseñado, evolucionado, diseñado, derivado o potenciado, o AAV generado a través de la evolución racional diseñada y/o dirigida y/o el reordenamiento de ADN, o una variante de AAV. El uso de un AAV modificado puede tener ciertas ventajas sobre un AAV no modificado, incluyendo, sin limitación, mayor eficiencia de transducción, mayor especificidad tisular o celular, menos reacciones inmunitarias y/o más adecuado para cierto tipo de administración (por ejemplo, inyección intravítrea o suministro a través del torrente sanguíneo).

En algunas realizaciones, un vector de rAAV modificado utilizado en el presente documento es un AAV pseudotipado. El pseudotipado de AAV se refiere a la mezcla de una cápside y un genoma de diferentes serotipos víricos. Estos serotipos se indican mediante una barra diagonal, de manera que AAV2/5 indica un virus que contiene el genoma (por ejemplo, ITR) del serotipo 2 empaquetado en la cápside del serotipo 5. En algunas realizaciones, un vector de rAAV es un vector AAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, AAV2/8, AAV2/6, AAV2/9, AAV2/4, AAV2/7, AAV2/10 o AAV2/12.

En algunas realizaciones, un vector de rAAV modificado utilizado en el presente documento es un AAV quimérico (en ocasiones también denominado híbrido o reordenado) que deriva de diferentes serotipos de AAV, incluso de diferentes serotipos de AAV aislados de diferentes especies. En algunas realizaciones, un vector de rAAV es AAV-DJ, AAV-DJ/8 o AAV-DJ/9. AAV-DJ es una variante de AAV generada a partir de bibliotecas de híbridos de AAV de ocho serotipos mediante el método de reordenamiento de ADN. Grimm, D. *et al.* (2008). *J. Virol.* 82: 5887-5911. Es capaz de transducir eficientemente una amplia gama de tipos celulares, incluyendo las células oculares. Por otro lado, los AAV quiméricos poseen más capacidad para evadir la neutralización inmunitaria que los AAV de origen natural y, por lo tanto, pueden suministrar eficientemente mayores cantidades de transgén terapéutico. Un AAV híbrido se puede modificar aún más. Por ejemplo, AAV-DJ/8 y AAV-DJ/9 se crearon realizando mutaciones puntuales en el dominio de unión a heparina (HBD) de AAV-DJ. Grimm, D. *et al.* (2008). *J. Virol.* 82: 5887-5911.

En algunas realizaciones, un rAAV modificado utilizado en el presente documento es un AAV mutante de la cápside. Implica la creación de una o más mutaciones (por ejemplo, mutaciones puntuales) en la proteína de la cápside del AAV. Los AAV mutantes de la cápside pueden tener ventajas sobre los AAV no modificados. Por ejemplo, se informó que la mutación puntual de los restos de tirosina (Y) expuestos en la superficie de la proteína de la cápside de AAV es un método simple y eficaz para evadir la fosforilación y la posterior ubiquitinación, conduciendo a una mayor eficiencia de transducción tanto *in vitro* como *in vivo* (Zhong *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2008;105(22): 7827-32; Markusic *et al.*, *Mol Ther.* 2010;18(12):2048-56; Li *et al.*, *Hum Gene Ther.* Noviembre de 2010; 21(11): 1527-1543). Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio de cada uno de los siete restos de tirosina de la cápside de AAV2 (Y252, Y272, Y444, Y500, Y700, Y704 e Y730) mediante la sustitución de restos de fenilalanina conduce a una mayor transducción de vectores y expresión transgénica al evitar la fosforilación de EGFR-PTK y la vía ubiquitina-proteosoma en células humanas *in vitro* y hepatocitos murinos *in vivo* (Zhong *et al.*, *Virology.* 25 de noviembre de 2008; 381(2):194-202). También se ha informado que las mutaciones puntuales en la cápside del AAV en restos específicos de tirosina (Y), serina (S), treonina (T) y lisina (K) podrían conducir a una mejora significativa de la transducción tanto *in vitro* como *in vivo* (Gabriel *et al.*, *Hum Gene Ther Methods.* 2013;24(2):80-93; Sen *et al.*, *Hum Gene Ther Methods.* 2013;24(2):104-16; Sen *et al.*, *Sci Rep.* 2013;3:1832; Wu *et al.*, *J Virol.* 2006;80(22):11393-7). También pueden realizarse mutaciones de la cápside en un AAV modificado para generar otro AAV modificado. Por ejemplo, AAV-DJ/8 y AAV-DJ/9 se crearon realizando mutaciones puntuales en el dominio de unión a heparina (HBD) de AAV-DJ, un AAV híbrido. Grimm, D. *et al.* (2008). *J. Virol.* 82: 5887-5911. Las mutaciones de la cápside también pueden hacer que un AAV evada los NAB y genere menos respuesta inmunitaria. Además, determinadas mutaciones de la cápside pueden hacer que un AAV sea más adecuado para el suministro intravítreo. Kay *et al.*, *PLoS One*, 8:e62097, 2013. En algunas realizaciones, un vector de rAAV utilizado en el presente documento es un AAV modificado con una o más mutaciones de la cápside, incluyen, sin limitación, de Tirosina a fenilalanina (Y-F), de Treonina a Valina (T-V), de Lisina a Arginina (K-R), de Treonina a Alanina (T-A), de Serina a Alanina (S-A) y/o que afectan al dominio de unión a heparina (HBD) del AAV, y/o en sus regiones antigénicas, incluyendo sin limitaciones en las posiciones 459, 493

y 551. En algunas realizaciones, un vector de rAAV es un AAV2 con una o más mutaciones de la cápside entre Y444F, Y500F, Y730F, Y252F, Y272F, Y700F, Y704F y T491V, en donde el número (por ejemplo, 444) indica la ubicación de una mutación puntual de la cápside de AAV. En algunas realizaciones, un vector de rAAV es un AAV5 con una o más mutaciones de la cápside entre Y263F y Y719F. En algunas realizaciones, un vector de rAAV es un AAV8 con una o más mutaciones de la cápside entre Y447F, Y733F y T494V. En alguna realización, un vector de rAAV es un AAV1 con un mutante de cápside de Y731F. En algunas realizaciones, un vector de rAAV es un AAV6 con una o más mutaciones de la cápside entre Y445F y Y731F. En algunas realizaciones, un vector de rAAV es un AAV9 con una mutación de la cápside de Y731F. En algunas realizaciones, un vector de rAAV es un AAV-DJ, AAV-DJ/8 o AAV-DJ/9 con una o más mutaciones de la cápside entre K137R, T251A y S503A.

En algunas realizaciones, un vector de rAAV modificado es un AAV con proteínas de la cápside de AAV variantes. Se conocen en la técnica variantes de proteínas de la cápside de AAV. En algunas realizaciones, una proteína de la cápside de origen no natural puede incluir una secuencia de AAV seleccionada (por ejemplo, un fragmento de una proteína de la cápside vp1) en combinación con secuencias heterólogas (por ejemplo, secuencias obtenidas de un serotipo de AAV seleccionado diferente, porciones no contiguas del mismo serotipo de AAV, de una fuente vírica no de AAV, o de una fuente no vírica). En algunas realizaciones, un vector de rAAV modificado incluye una o más inserciones de aminoácidos (por ejemplo, de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos) en el bucle de GH de la proteína de la cápside. Las proteínas de la cápside de AAV variantes pueden conferir una mayor infectividad de una célula retiniana en comparación con la infectividad de la célula retiniana por un AAV no variante (por ejemplo, AAV de tipo silvestre). En algunas realizaciones, un AAV modificado es aquel que puede suministrar el transgén a través de la barrera hematoocular (BHO), lo que lo hace adecuado para su suministro a través del torrente sanguíneo, ofreciendo una vía de administración/suministro alternativa a las administraciones convencionales (por ejemplo, inyección subretiniana o inyección intravítrea) utilizadas en la terapia génica ocular. En algunas realizaciones, un rAAV con proteínas de la cápside de AAV variantes es un AAV 7m8, o sus derivados o variantes (Dalkara *et al.*, *Science Translation Medicine*, 5:189ra76, 2013; Solicitud PCT n.º PCT/US2012/034413, Solicitud PCT n.º PCT/US2014/039015, Solicitud de los EE. UU. n.º 14/214.011 y Solicitud de los EE. UU. n.º 13/899.481). En algunas realizaciones, un rAAV con proteínas de la cápside de AAV variantes es un AAV-PHP.B.

En algunas realizaciones, un vector de rAAV se puede reconstruir o sintetizar mediante la reconstrucción del linaje revolucionario vírico. Dicha reconstrucción puede producir AAV ancestrales, antiguos o parentales. En una realización, un vector de rAAV es un Anc80 (un ancestro de AAV1, 2, 8 y 9) o su derivado. Zinn *et al.*, *Cell Rep.* 11 de agosto de 2015; 12(6):1056-68.

En algunas realizaciones, se pueden modificar uno o más rAAV y/u otros vectores víricos (por ejemplo, optimizar para el suministro intravítreo, para una transducción potenciada en el tipo de célula diana (por ejemplo, células RPE) o para el suministro a través del torrente sanguíneo) mediante técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, "evolución dirigida" y/o "diseño racional". Véase, por ejemplo, Asuri *et al.*, *Mol Ther.* 20:329-338, 2012 e Yang *et al.*, *Methods Mol Biol.* 709:127-139, 2011. Los AAV modificados u otros vectores víricos se pueden describir como, por ejemplo, vectores "modificados", "híbridos", "evolucionados", "potenciados" o "diseñados". Dichas modificaciones pueden, por ejemplo, mejorar el direccionamiento de vectores (por ejemplo, mejorando la idoneidad para el suministro intravítreo o para el suministro a través del torrente sanguíneo), la eficiencia de transducción y/o reducir la reacción inmunitaria, dando como resultado, por ejemplo, que se necesita una dosis menor. En algunas realizaciones, un vector de rAAV es un serotipo de AAV rh10 (documento EP 20100178940) o ShH10. En algunas realizaciones, un vector de rAAV es un AAV-PHP.B (documento US 20150079038).

En algunas realizaciones, se puede generar y/o seleccionar un vector de rAAV a partir de una combinación de más de una estrategia establecida en el presente documento. Por ejemplo, AAV-DJ/8 y AAV-DJ/9 se crearon realizando mutaciones puntuales en el dominio de unión a heparina (HBD) de AAV-DJ, un AAV híbrido.

Se sabe en la técnica que determinados AAV pueden ser más adecuados para el suministro intravítreo que algunos otros AAV. Muchos de estos AAV para el suministro intravítreo implican la modificación de la proteína de la cápside del AAV mediante mutaciones (por ejemplo, AAV2 (quadY-F+T-V) (Kay *et al.*, *PLoS One.* 26 de abril de 2013; 8 (4)) o proteínas de la cápside de AAV variantes (por ejemplo, AAV 7m8). Asimismo, existen AAV adecuados para el suministro a través del torrente sanguíneo, por ejemplo, AAV-PHP.B. Su uso, sin embargo, no se limita al suministro intravítreo o a través del torrente sanguíneo, por ejemplo, también pueden usarse como vectores de AAV para vías de administración subretinianas y otras.

En algunas realizaciones, se usa un vector de rAAV autocomplementario (scAAV). Los AAV de tipo silvestre tienen un genoma de ADN monocatenario. Una desventaja del AAV es su genoma de ADN monocatenario. Debido a que el genoma de AAV monocatenario depende de la maquinaria de replicación de ADN de la célula para sintetizar la cadena complementaria, la expresión del transgén se retrasa y no es tan robusta como el ADN bicatenario. Para la terapia génica con CYP4V2, los presentes inventores desarrollaron un diseño de scAAV (véase la Figura 7) para evitar la síntesis de segunda cadena que limita la velocidad en vectores de AAV monocatenarios convencionales y para facilitar una expresión transgénica robusta. El scAAV.CYP4V2 comprende una estructura de ADN de CYP4V2 autocomplementaria intramolecular que elimina la necesidad de síntesis de ADN de la célula hospedadora

y da como resultado una expresión más rápida y robusta tras la transducción. La estructura autocomplementaria de un scAAV, sin embargo, reduce el límite de empaquetamiento del vector de scAAV de aproximadamente 4,7-5,0 kb para ssAAV a aproximadamente 2,4-2,5 kb para scAAV. Por lo tanto, se requieren secuencias reguladoras de longitud más corta (por ejemplo, promotor, potenciador y/o señal de poli A) en un diseño de scAAV. Para garantizar que el casete de expresión no supere el límite de empaquetamiento del vector y dependiendo de la longitud del ADNc y otras secuencias reguladoras utilizadas, es posible que sea necesario excluir cierta secuencia reguladora opcional de la construcción de scAAV, tal como un potenciador. Una de las dos ITR en un diseño de scAAV es una ITR truncada y tiene una mutación en el sitio de resolución terminal (TRS). Para un análisis detallado sobre la estructura, purificación y producción de scAAV, véase McCarthy, *Molecular Therapy*, Volumen 16, Número 10, p1648-1656, octubre de 2008.

Pueden utilizarse varios otros diseños de vectores. Por ejemplo, pueden usarse un sistema de vector dual (por ejemplo, un sistema de vector dual basado en AAV, por ejemplo, vectores de AAV duales híbridos o trans-corte y empalme) para expresar una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de CYP4V2). Véase, por ejemplo, Colella, *et al.*, *Gene Ther.* 21, 450-456, 2014. Por ejemplo, un sistema de vector dual puede incluir (i) un primer polinucleótido de vector de AAV que tiene una repetición terminal invertida en cada extremo (extremo 5' y 3') del polinucleótido, y entre las repeticiones terminales invertidas, un promotor adecuado unido operativamente a una secuencia codificante parcial que codifica una parte N-terminal de la proteína codificada por la secuencia de ácido nucleico de interés; y ii) un segundo polinucleótido de vector de AAV que tiene una repetición terminal invertida en cada extremo (extremo 5' y 3') del polinucleótido, y entre las repeticiones terminales invertidas, una secuencia codificante parcial que codifica una parte C-terminal de la proteína codificada por la secuencia de ácido nucleico de interés, seguido de una secuencia señal de poliadenilación (pA).

Se diseñaron y generaron diversos vectores de rAAV para el estudio, incluyendo scAAV2/1, AAV2/2, AAV2/5, scAAV2/5, AAV2/8, scAAV2/9 y AAV2/2 (Y444F+Y500F+Y730F) (véase los dibujos esquemáticos y las anotaciones en la Figura 7 del presente documento). Demuestran que pueden usarse vectores de rAAV de diversos diseños de vectores en la terapia génica con CYP4V2. Asimismo, la inclusión de múltiples vectores de rAAV como opciones puede ayudar a reducir la posible respuesta inmunitaria en la terapia génica con CYP4V2 dados los anticuerpos neutralizantes preexistentes y otras respuestas inmunitarias individuales contra determinados tipos de AAV entre la población de pacientes. También proporcionaría más opciones si se desea una administración posterior en el mismo ojo o una administración en el ojo contralateral del mismo sujeto.

Se conocen en la técnica métodos para producir vectores de suministro víricos, incluyendo la producción usando un sistema sin auxiliar. Véase, por ejemplo, el documento PCT/US2007/010055; la patente n.º: 6458587, la patente n.º: US 6428988 B1). La producción de diversos vectores utilizados en terapia génica, incluyendo, sin limitación, vectores de AAV, adenovirus, lentivirus y retrovirus, también está disponible en el mercado a través de organizaciones de investigación por contrato (CRO) y organizaciones de fabricación por contrato (CMO), por ejemplo, Vector Biolabs (Malvern, PA) y Cell Biolabs, Inc., (San Diego, CA).

En algunas realizaciones, se puede generar un vector de AAV recombinante útil en los métodos descritos en el presente documento cultivando una célula hospedadora (por ejemplo, una célula HEK293) que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de la cápside del serotipo de AAV, o un fragmento de la misma; un gen rep; un minigen que comprende, como mínimo, repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV y una molécula de ácido nucleico de interés (por ejemplo, que tiene una secuencia de ácido nucleico de CYP4V2); y suficientes funciones auxiliares para permitir el empaquetado del ácido nucleico de interés en la proteína de la cápside de AAV. Los componentes que se deben cultivar en la célula hospedadora para empaquetar un ácido nucleico en una cápside de AAV pueden proporcionarse a la célula hospedadora en cis o trans. Como alternativa, uno o más de los componentes requeridos (por ejemplo, molécula de ácido nucleico de interés, secuencias rep, secuencias cap y/o funciones auxiliares) pueden ser proporcionadas por una célula hospedadora estable que se ha modificado para contener uno o más de los componentes requeridos. Cualquiera de estos componentes puede seleccionarse entre cualquier serotipo adecuado. Por ejemplo, se generan vectores de rAAV cotransfectando células productoras (por ejemplo, células HEK 293) con (a) un plásmido (plásmido cis de AAV) que contiene un genoma de AAV recombinante clonado compuesto por el gen de interés (por ejemplo, un ADNc que codifica CYP4V2) y otras secuencias reguladoras deseadas flanqueadas por las dos ITR de AAV, (b) una construcción separada que expresa en trans los genes víricos de AAV Rep y Cap. (c) los factores auxiliares de adenovirus, que son proporcionados por infección por adenovirus o por transfección en células productoras de un tercer plásmido que proporciona estos factores auxiliares de adenovirus. Además de las células HEK293, pueden usarse otras estirpes celulares en la producción de vectores de rAAV, incluyendo, sin limitación, células HeLa, Vero, A549, B50, WI38 y BHK.

En algunas realizaciones, el vector de rAAV es un virus rAAV2, un virus rAAV2/5, un virus rAAV2/8, un virus rAAV2/1, un virus rAAV2/4, un virus rAAV2/6, un virus rAAV2/9, un virus rAAV2/12 o un virus rAAV con elementos de la cápside de uno o más del virus AAV1, AAV2, AAV5, AAV8, AAV9 y/o AAV 12. En una realización, el vector de suministro de rAAV es un virus rAAV con una o más mutaciones Y-F, incluyendo, sin limitación, AAV2 (Y444F+Y500F+Y730F) o AAV8 (Y733F).

En algunas realizaciones, el vector de rAAV es un virus rAAV monocatenario (ssAAV). En algunas realizaciones, el vector es un vector de rAAV autocomplementario (scAAV).

Además de los vectores de AAV, pueden usarse otros vectores víricos en la terapia génica con CYP4V2. Por ejemplo, también se ha demostrado que los vectores adenovíricos son útiles para el suministro de genes. Por ejemplo, Mori *et al.*, 2002. *IOVS*, 43:1610-1615 divulga el uso de un vector adenovírico que tiene un Ad de tipo 5 con delección de E-1 y delección parcial de E-3 en el que el transgén (proteína fluorescente verde) es impulsado por un promotor CMV. Los niveles máximos de expresión se demostraron tras la inyección de 10^7 a 10^8 partículas víricas, con la inyección subretiniana que proporciona niveles de expresión más altos que la inyección intravítrea.

También pueden usarse vectores no víricos en la terapia génica con CYP4V2. Los ejemplos de vectores no víricos incluyen, sin limitación, ácidos nucleicos desnudos, dendrímeros, liposomas (por ejemplo, liposomas catiónicos o aniónicos), polímeros (por ejemplo, políplexos), sistemas lípido-polímero y nanopartículas (por ejemplo, nanopartículas inorgánicas o sintetizadas). Por ejemplo, la transferencia génica ocular no vírica eficiente fue demostrada por Farjo *et al.*, 2006, *PLoS 1:e38*, quienes usaron nanopartículas de ADN compactadas como sistema para la transferencia génica no vírica a tejidos oculares. Como prueba de concepto, se usó la construcción de expresión pZEEGFP5.1 (5147 pb) que codifica el ADNc de la proteína fluorescente verde (GFP) potenciado controlado transcripcionalmente por el promotor y potenciador temprano inmediato de CMV. Las nanopartículas de ADN se formularon mezclando ADN plasmídico con CK3OPEG10K, un péptido de lisina de 30 unidades con una cisteína N-terminal que se conjuga mediante un enlace maleimida con polietilenglicol de 10 kDa usando métodos conocidos. Las nanopartículas se concentraron hasta 4 mg/ml de ADN en solución salina. El ADN compactado se suministró en una dosis de 0,6 µg a la cavidad vítrea. Se observó expresión de GFP en el cristalino, la retina y el epitelio pigmentario/coroides/esclerótica mediante PCR y microscopía.

Además, se han concedido varias patentes para métodos de transferencia génica oculares incluyendo, pero sin limitación, la patente de los EE. UU. n.º 7.144.870 que proporciona métodos de transducción adenovírica mediada por ácido hialurónico; las patentes de los EE. UU. n.º 7.122.181 y 6.555.107 que proporcionan vectores lentivíricos y su uso para mediar el suministro génico ocular; la patente de los EE. UU. n.º 6.106.826 que proporciona vectores víricos del herpes simple y su uso para mediar el suministro génico ocular; y la patente de los EE. UU. n.º 5.770.580 que proporciona vectores de expresión de ADN y su uso para mediar el suministro génico ocular.

En la sección de Ejemplos del presente documento se proporciona un método para cribar y seleccionar vectores adecuados para su uso en la terapia génica con CYP4V2 a partir de diferentes vectores. Los Ejemplos usaron diferentes vectores de AAV para ilustrar el método. Se entenderá que dicho método también puede ser utilizado por los expertos en la materia para comparar y seleccionar entre diferentes tipos de vectores, por ejemplo, vectores víricos frente a no víricos, adenovirus frente a AAV, lentivirus frente a AAV, HSV frente a AAV, etc.

C. Casetes de expresión y secuencias reguladoras de CYP4V2

La divulgación también proporciona un casete de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CYP4V2 funcional (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1, 2 o 3) y una secuencia de control de expresión unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica CYP4V2. Además de la molécula de ácido nucleico que codifica una proteína CYP4V2 funcional, los otros elementos clave de un casete de expresión utilizado en la terapia génica con CYP4V2 incluyen una o más secuencias reguladoras para controlar la expresión de dicha molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, el casete de expresión está empaquetado en un vector de suministro de rAAV flanqueado por las ITR de AAV para una eficiencia potenciada de suministro, transducción y/o expresión. En los métodos descritos en el presente documento puede usarse cualquier ITR de AAV. Los vectores de ssAAV descritos en los Ejemplos del presente documento contienen dos ITR de AAV2 de aproximadamente 141 pb cada una (secuencias de ejemplo mostradas en las SEQ ID NO: 42 y 43). El vector del scAAV descrito en los Ejemplos contiene dos ITR de AAV2, una de las cuales está truncada (secuencias de ejemplo mostradas en las SEQ ID NO: 44 y 45). Una ITR de AAV2 por lo general tiene una longitud de aproximadamente 132 a aproximadamente 167 pb dependiendo del vector parental que se use.

Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia reguladora" se refiere a cualquier elemento genético (por ejemplo, secuencia de polinucleótidos) que puede ejercer un efecto regulador sobre la replicación o expresión (transcripción o traducción) de la secuencia de ácido nucleico, o de otro modo dirigir, influir y/o regular la expresión de la secuencia de ácido nucleico. Las secuencias de control de expresión comunes incluyen promotores, señales de poliadenilación (poliA), potenciadores, dominios reguladores en dirección 5', intrones, UTR, elementos de respuesta o elementos inducibles, orígenes de replicación, sitios internos de entrada a ribosomas (IRES), secuencias de inicio de la transcripción, secuencias de terminación, secuencias de procesamiento de ARN tales como secuencias de corte y empalme y poliadenilación (poliA), secuencias que estabilizan el ARNm citoplásmico, secuencias que potencian la eficiencia de la traducción (es decir, secuencia de consenso Kozak), secuencias que potencian la estabilidad de la proteína o secuencias que potencian la secreción de la proteína codificada. Las secuencias reguladoras pueden ser de origen bacteriano, de levadura, de insecto, de mamífero o vírico o pueden ser derivados, híbridos o variantes de las mismas, o pueden ser sintéticas, y los vectores pueden

contener una combinación de secuencias reguladoras de diferentes orígenes. Por ejemplo, las secuencias reguladoras pueden ser heterólogas (por ejemplo, de un origen diferente o de un gen diferente; por ejemplo, de un gen distinto de CYP4V2) u homólogas (por ejemplo, del mismo gen; por ejemplo, de un gen CYP4V2) con respecto a la secuencia codificante cuya expresión están regulando (por ejemplo, un gen CYP4V2). Como se usa en el presente documento, "unido/a operativamente" significa que un promotor y/u otra secuencia o secuencias reguladoras están posicionados con respecto a una secuencia codificante de ácido nucleico de manera de dirigir, influir o regular la expresión de la secuencia codificante de ácido nucleico. Una secuencia reguladora puede estar "unida operativamente" con una secuencia codificante de ácido nucleico en el mismo vector o en un vector diferente. Una o más secuencias reguladoras unidas operativamente a una secuencia codificante de ácido nucleico pueden ser contiguas y/o pueden actuar en trans o a distancia para dirigir, influir o regular la expresión de la secuencia codificante de ácido nucleico. Entre las secuencias reguladoras, un promotor es esencial, mientras que otras secuencias reguladoras tales como potenciadores, intrones y terminadores pueden ser beneficiosos, pero son opcionales.

Pueden usarse diversas secuencias de promotores para impulsar la expresión de una secuencia codificante de ácido nucleico. Algunos promotores son promotores constitutivos, que dirigen la expresión en prácticamente todos los tejidos y en la mayoría de los tipos celulares, mientras que otros promotores están más controlados. Los promotores regulados pueden actuar solo en determinados tejidos o células (es decir, promotores histoespecíficos o con especificidad celular) o en determinados momentos del desarrollo (es decir, promotores específicos de la fase de desarrollo) y/o pueden estar condicionados a condiciones ambientales o estímulos externos tales como un producto químico, niveles de oxígeno, calor o luz (es decir, promotores inducibles).

En algunos casos, puede ser deseable usar un promotor constitutivo (o ubicuo). Los promotores constitutivos de ejemplo incluyen, sin limitación, el promotor de citomegalovirus (CMV) (Gray *et al.*, *Hum Gene Ther.* Septiembre de 2011; 22(9): 1143-1153; Norman *et al.*, *PLoS ONE* 5(8): e12413, Agosto de 2010), el promotor de la β -actina de pollo, el promotor CAG híbrido (también conocido como CAGGS, CBA o CB) derivado de CMV/beta actina de pollo/beta-globina de conejo (Miyazaki J, Takaki S, Araki K, Tashiro F, Tominaga A, Takatsu K, Yamamura K. 1989. El sistema de vector de expresión basado en el promotor de la β -actina de pollo dirige la producción eficiente de interleucina-5. *Gene* 79: 269-277; Acland, G. M. *et al. Mol Ther*, 2005, 12:1072-1082), el pequeño promotor CBA (smCBA) (-953 pb, véase, Mah, *et al.* 2003, *Hum. Gene Ther.* 14:143-152; Haire, *et al.* 2006 *IOVS*, 2006, 47:3745-3753), el promotor CBh (-800 pb, véase, Gray *et al.*, *Hum Gene Ther.* Septiembre de 2011; 22(9): 1143-1153), el promotor de la β -actina humana (ACTB) (Norman *et al.*, *PLoS ONE* 5(8): e12413, Agosto de 2010), el promotor del factor de elongación 1 alfa (EF-1 alfa) (véase, Gill *et al.*, *Gene Ther.* 2001;8(20):1539-1546; Norman *et al.*, *PLoS ONE* 5(8): e12413, Agosto de 2010), el promotor de la fosfoglicerato cinasa (PGK, humana o de ratón) (Norman *et al.*, *PLoS ONE* 5(8): e12413, Agosto de 2010), el promotor de Ubiquitina C (UBC) (Norman *et al.*, *PLoS ONE* 5(8): e12413, Agosto de 2010), el promotor GUSB (Glucuronidasa Beta), el promotor mínimo GUSB (hGBp) (Husain, *Gene Therapy* (2009) 16, 927-932), el promotor UCOE, el promotor del factor de elongación 1 α corto (EFS), el promotor del virus 40 de simio (SV40), el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV), Véase, por ejemplo, Powell, *Discov Med.* Enero de 2015; 19(102): 49-57, para una comparación general y un análisis de diversos promotores. Debe entenderse que en algunos casos los promotores "constitutivos" o "ubicuos" pueden ser propensos a silenciar o promover la fuerza de expresión diferencial en tipos celulares seleccionados, véase, por ejemplo, McCown *et al.*, *Brain Res.* 1996;713(1-2):99-107; Gray *et al.*, *Hum Gene Ther.* 2011; 22:1143-1153.

En algunos casos, es deseable usar un promotor histoespecífico o con especificidad celular, que dirige la expresión de una secuencia codificante de ácido nucleico en un tipo particular de célula o tejido. Basándose en la divulgación del presente documento, se apreciará que un promotor histoespecífico o con especificidad celular puede ser específico para una célula o tejido ocular, o para linfocitos. Los tipos de células oculares incluyen, sin limitación, células retinianas, células retinianas bipolares, células fotorreceptoras, células de bastón y células de cono, células ganglionares, células del epitelio pigmentario retiniano (RPE), células coroideas o células del epitelio corneal. Por tanto, un promotor específico de célula como se describe en el presente documento puede ser un promotor específico de retina (por ejemplo, específico de RPE, específico de fotorreceptor (por ejemplo, específico de cono y/o específico de bastón) y/o específico de coroides) o un promotor específico de córnea. Los ejemplos de promotores específicos de células oculares incluyen, sin limitación, el promotor de la proteína cinasa 1 del receptor acoplado a proteína G humana también conocido como rodopsina cinasa 1 (GRK1) (número de acceso de Genbank AY327580), un fragmento de 292 nt (posiciones 1793-2087) del promotor GRK1 (véase, Beltran *et al.*, *Gene Therapy* 17:1162-74, 2010), el promotor proximal de la proteína de unión a retinoides interfotorreceptores humana (IRBP), un fragmento de 235 nt del promotor hIRBP, el promotor proximal RPGR, el promotor de opsina de color rojo, el promotor de opsina rojo-verde, el promotor de opsina de color azul, el promotor de opsina de ratón (tanto en versión larga como corta, Le *et al.*, *Molecular Vision* 2006; 12:389-398; Beltrán *et al.*, *Gene Therapy* 17: 1162-74, 2010), el promotor de rodopsina (Rho) (Mussolino *et al.*, *Gene Therapy*, 18:637-45, 2011); la subunidad alfa de transducina de cono (Morrissey *et al.*, *BMC Dev. Biol.* 11:3, 2011); promotor de beta fosfodiesterasa (PDE); el promotor de retinosis pigmentaria (RP1) (Nicord *et al.*, *J. Gene Vied.* 9: 1015-23, 2007), el promotor NXNL2/NXNL1 (Lambard *et al.*, *PLoS One*, 5:e13025, 2010), el promotor RPE65 (Li *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, Diciembre de 2002, Vol. 43, 3640); el promotor de degeneración retiniana lenta/periferina 2 (Rds/perphZ) (Cai *et al.*, *Exp Eye Res*, 91: 186-94, 2010), el promotor VMD2 (distrofia macular viteliforme 2; también conocido como BEST1, Kachi *et al.*, *Human Gene Therapy*, 20:31-9, 2009), el promotor

IRBP/GNAT2 (potenciador hIRBP fusionado con el promotor de transducina alfa de cono), el promotor Rds (degeneración retiniana lenta), el promotor hPDE6b o el promotor VEcad (promotor VE-cadherina/Cadherina 5 (CDH5)/CD144). Se apreciará que pueden usarse otros promotores conocidos en la técnica en lugar de, o además de, cualquiera de los promotores de ejemplo proporcionados en el presente documento basándose en los fundamentos y los análisis proporcionados en el presente documento.

Los promotores inducibles de ejemplo incluyen, sin limitación, un promotor sensible al calcio (por ejemplo, el promotor NFAT, véase, *Gene Ther.* Marzo de 2013; 20(3):248-54), el promotor de metaliohionina (MX) de oveja inducible por cinc, el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), el sistema promotor de la polimerasa T7; el promotor de la ecdisona de insecto, el sistema reprimible por tetraciclina, el sistema inducible por tetraciclina, el sistema inducible por RU486, el sistema inducible por rapamicina, una serie de promotores inducibles disponibles en el mercado y promotores inducibles regulados por un estado fisiológico específico, por ejemplo, temperatura, fase aguda, un estado de diferenciación particular de la célula o únicamente en células en replicación. En algunas realizaciones, el promotor inducible es aquel que está estrechamente regulado y es específico para un tipo celular ocular particular.

Un promotor puede ser un híbrido de, o una versión truncada/acortada o modificada de, o derivada de otro modo, de otro promotor y/u otra secuencia reguladora, por ejemplo, el promotor CAG es un híbrido del potenciador temprano inmediato de CMV, el promotor de la beta actina de pollo y el gen de la beta globina de conejo, el promotor smCBA es una versión truncada del promotor CBA. Un promotor puede contener otros elementos, por ejemplo, un intrón, exón y/o un potenciador, por ejemplo, el promotor CAG. Puede usarse más de un promotor juntos en un casete de expresión.

En algunos casos, puede ser deseable usar una secuencia de potenciador para aumentar y/o estabilizar la expresión por encima de la que se produce debido al promotor. Las secuencias de potenciadores representativas incluyen, sin limitación, un elemento regulador postranscripcional (por ejemplo, un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (también conocido como WPRE) o un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis B (también conocido como HPRE o HBVPRE, Donello *et al.*, *J Virol.* Junio de 1998; 72(6):5085-92; Sun *et al.*, *DNA Cell Biol.* Mayo de 2009; 28(5): 233-240), o diversos WPRE acortados, mutantes o modificados, por ejemplo, un WPRE acortado de -247 pb que contiene elementos gamma y alfa mínimos del WPRE (Choi *et al.*, *Mol Brain.* 2014; 7: 17; Donello *et al.*, *J Virol.* Junio de 1998; 72(6): 5085-5092; Zanta-Boussif *et al.*, *Gene Therapy* (2009) 16, 605-619) o el potenciador 1RBP (Nicord *et al.*, *J. Gene Med.* 9: 1015-23, 2007), un potenciador del elemento de transporte constitutivo (CTE) (por ejemplo, el CTE del virus del mono Mason-Pfizer o el CTE del virus de la leucemia aviar), el potenciador temprano inmediato del citomegalovirus (CMV), uno derivado de un gen de inmunoglobulina o potenciador SV40, o el elemento que actúa en cis identificado en el promotor proximal de ratón, una secuencia reguladora de intrones, por ejemplo, un donante/aceptor de corte y empalme de mini-intrones denominado SD-SA derivado de SV-40, un sitio interno de entrada a ribosomas (IRES), que puede usarse para producir más de un polipéptido a partir de un único transcrito génico, por ejemplo, una proteína que contiene más de una cadena polipeptídica, o dos proteínas diferentes, puede ser una secuencia de entrada ribosómica interna de poliovirus, que respalda la expresión transgénica en células RPE, fotorreceptoras y ganglionares.

La poliadenilación de un transcrito es importante para la exportación nuclear, la traducción y la estabilidad del ARNm. Por lo tanto, la eficiencia de la poliadenilación de la transcripción es importante para la expresión transgénica. Las secuencias de señal de PoliA representativas incluyen, sin limitación, una señal de poliA de SV40, una señal de poliA tardía de SV40, una señal de poliA temprana de SV40, una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovino (poli A de bGH), una poliA pequeña o una señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento humano (poliA de hGH). En algunos casos, puede usarse una secuencia potenciadora en dirección 5' (USE) para aumentar la eficiencia de una señal de poliA, por ejemplo, 2xUSE tardía de SV40, USE de VIH-1 (Virus de inmunodeficiencia humana 1), USE de GHV (Virus de la hepatitis de la ardilla terrestre), USE de Adenovirus (L3) (Adenovirus), USE de hTHGB (protrombina humana) o USE de hC2 (gen del complemento C2 humano) (Schambach A, Galla M, Maetzig T, Loew R, Baum C. *Improving transcriptional termination of self-inactivating gamma-retroviral and lentiviral vectors.* *Mol Ther.* 2007; 15(6):1167-1173).

Al igual que las secuencias de promotores, las otras secuencias reguladoras utilizadas en un casete de expresión pueden ser un híbrido de, versiones acortadas/truncadas, modificadas o derivadas de otro modo de una secuencia reguladora. Por ejemplo, el WPRE acortado, el 2 x USE tardío de SV40, la poliA tardía de SV40. Además de los elementos descritos en el presente documento, un casete de expresión también puede contener otras secuencias reguladoras, por ejemplo, intrones, UTR y secuencias enlazadoras. Se ha demostrado que la inclusión de un sitio de corte y empalme (es decir, un exón flanqueado por dos intrones) es útil para aumentar la expresión génica de proteínas a partir de casetes de expresión.

Se sabe en la técnica que es común que una secuencia reguladora o una secuencia reguladora híbrida tenga múltiples versiones y tenga más de un nombre. Por ejemplo, diversos promotores, potenciadores y señales de poliA tienen múltiples versiones, incluyendo, sin limitación, el promotor CMV, promotor EF1 α , el potenciador WPRE y la señal de poliA SV40. El promotor CAG tiene múltiples nombres alternativos que incluyen, sin limitación, el

promotor CBA, promotor CB o promotor CAGGS. Asimismo, también se sabe en la técnica que una secuencia reguladora puede acortarse, modificarse o combinarse con otras secuencias para generar un derivado o variante, por ejemplo, el promotor CAG (también conocido como CBA, CB o CAGGS) es un híbrido del potenciador temprano inmediato de CMV, el promotor de la beta actina de pollo y el gen de la beta globina de conejo, el promotor smCBA es un promotor CAG truncado, el CB^{SB} promotor es un promotor CAG acortado, que difieren en aproximadamente 152 pb en el extremo 5' del potenciador temprano inmediato de CMV. Además, una secuencia reguladora puede denominarse de otra manera, por ejemplo, un elemento regulador postranscripcional tal como HPRE o WPRE también puede denominarse potenciador. Cualquier secuencia reguladora descrita en el presente documento contempla todas las variaciones, derivados y/o híbridos de dicha secuencia reguladora. Cualquier secuencia de ejemplo proporcionada en el presente documento relacionada con una secuencia reguladora es de naturaleza de ejemplo y no limita la definición o el alcance de dicha secuencia reguladora a la que se muestra en la secuencia de ejemplo.

En algunas realizaciones, la técnica de microARN (miARN) puede usarse en el diseño del casete de expresión para lograr una especificidad de expresión específica, por ejemplo, mediante la represión de la expresión transgénica fuera de la diana. Simplemente a modo de ejemplo y sin limitación, se puede añadir una secuencia diana para miR181 (un miARN que se ha demostrado que se expresa exclusivamente en células ganglionares y en la retina interna) inmediatamente en dirección 3' del ADNc de CYP4V2 para inhibir la síntesis de la proteína CYP4V2 mediada por casetes de expresión en células ganglionares y células retinianas internas. De forma similar, puede usarse una secuencia diana para un miARN que se expresa exclusivamente en determinados tipos celulares para reprimir la expresión de la proteína CYP4V2 mediada por casete de expresión en estos tipos celulares para lograr una expresión dirigida histoespecífica o con especificidad celular.

D. Diseño de casetes de expresión y vectores de suministro eficientes para la terapia génica con CYP4V2

En la sección Ejemplos del presente documento se proporciona un análisis detallado sobre el casete de expresión de CYP4V2 y el método de diseño del vector de suministro y diversos diseños para estos estudios.

Uso del promotor EFS y/o señal de PoliA pequeña (SPA) en el tratamiento de una enfermedad ocular

Como se analiza en el presente documento, un vector de suministro de genes tiene un límite de tamaño de empaquetamiento. Por ejemplo, los vectores de AAV monocatenarios tienen un límite de empaquetamiento de aproximadamente 4,7-5,0 kb, superando el cual la eficiencia de transducción y expresión caería significativamente. Para AAV autocomplementarios (scAAV), el límite de empaquetamiento se reduce a la mitad a aproximadamente 2,4-2,5 kb. Por lo tanto, el tamaño sí importa para la terapia génica y el suministro de genes mediado por vectores. Para vectores autocomplementarios bicatenarios, es deseable y en ocasiones crítico usar secuencias reguladoras de tamaño pequeño para dejar suficiente espacio para el transgén (por ejemplo, ADNc). Debido a esta limitación de tamaño, los promotores grandes tampoco son adecuados para su uso con scAAV. Para la terapia génica con CYP4V2, dado que el tamaño del ADNc es de aproximadamente 1578 pb y las ITR de AAV (con mutación) son de aproximadamente 258 pb, solo quedan entre 500 y 600 pb para las secuencias reguladoras. Debido a que CYP4V2 se expresa casi ubicuamente, en algunas realizaciones, es deseable usar un promotor constitutivo para impulsar la expresión del transgén de CYP4V2. Sin embargo, no hay espacio para el promotor CAG constitutivo que se usó en el diseño de AAV monocatenario, que mide aproximadamente 1,7 kb, ni para un promotor CBA acortado (smCBA), que mide aproximadamente 953 pb, ni para el promotor CBh, que mide aproximadamente 800 pb, ni para muchos otros promotores constitutivos tales como el promotor CMV que tiene aproximadamente 600 pb. En lugar de ello, puede usarse un promotor EFS de longitud corta (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 34) para el diseño de scAAV. La misma limitación de tamaño se aplica a otras secuencias reguladoras, por ejemplo, señal de poli A. Una Poli A de bGH tiene aproximadamente 225 pb, una poli A de SV40 tiene aproximadamente 240 pb y una poli A tardía de SV40 tiene aproximadamente 120 pb. Cualquiera de ellas ocuparía una porción grande de la longitud de ~500 pb que queda para las secuencias reguladoras, incluyendo el promotor. Por lo tanto, se usó una señal de poliA pequeña (SPA), que tiene solo aproximadamente 54 pb (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 35) para el diseño de scAAV.

El diseño que usa un promotor EFS y una SPA solo ocupa aproximadamente 300 pb y junto con las ITR de AAV ocupan un total de aproximadamente 600 pb, dejando por lo tanto aproximadamente 1,8-1,9 kb de espacio de empaquetamiento restante para la secuenciación de ácido nucleico que codifica la proteína deseada y cualquier otra secuencia en un casete de expresión diseñado para un scAAV, y dejando aproximadamente 4,1-4,4 kb de espacio de empaquetamiento restante para la secuenciación de ácido nucleico que codifica la proteína deseada y cualquier otra secuencia en un casete de expresión diseñado para un ssAAV. Como resultado, se pueden empaquetar ADNc de mayor tamaño y/u otras secuencias en un vector de rAAV con el promotor EFS y la SPA, en comparación con el uso de promotores y secuencias señal de poliA más grandes, incluyendo, sin limitación, promotor CMV, promotor CAG, promotor smCBA, promotor CBh, promotor EF1 alfa, poliA de bGH, poliA de SV40 y poliA tardía de SV40.

En la Figura 4b se proporciona un esquema del casete de expresión que comprende el promotor EFS y la SPA. La construcción que se muestra en la Figura 7b incluye un ADNc de CYP4V2. El ADNc de CYP4V2 puede

reemplazarse por otro gen de interés para el casete de expresión que se usará para otra expresión transgénica.

En este estudio se sometió a ensayo el uso del promotor EFS y la SPA en un casete de expresión y un vector de suministro para impulsar una secuencia codificante de ácido nucleico para tratar una enfermedad ocular. Se generó un vector de scAAV2/1 que contenía el promotor EFS, un ADNc de CYP4V2 y la SPA, denominado scAAV1-EFS.CYP4V2op.SPA. El scAAV1-EFS-CYP4V2op-SPA se aplicó en las células iPS-RPE de un paciente con BCD. El scAAV1-EFS-CYP4V2op-SPA mostró una acción rápida y robusta en células iPS-RPE de pacientes con BCD en solo 4 días a pesar de las cortas longitudes del promotor EFS y de la SPA (véase la Tabla 3). Demuestra que el promotor EFS y/o la SPA son secuencias reguladoras de tamaño pequeño que son muy útiles en un sistema de scAAV para terapia génica ocular. Asimismo, la expresión robusta de los vectores de scAAV hace que el diseño de scAAV también sea adecuado para otras vías de suministro (por ejemplo, suministro intravítreo) además del suministro subretiniano.

El uso del promotor EFS y/o la SPA no se limita a la terapia génica con CYP4V2 o en una construcción de scAAV. Pueden usarse para una terapia génica que implique otros genes, donde el tamaño del transgén y/o un diseño de scAAV requiere el uso de un promotor de longitud corta y una señal de poliA para impulsar una expresión de proteína rápida y suficiente.

E. Opciones de tratamiento, selección de sujetos y administración

La terapia génica con CYP4V2 puede aplicarse de múltiples formas. En algunos casos, el tratamiento puede aplicarse *in vivo* a un sujeto (por ejemplo, un paciente con BCD) a través de un suministro eficaz de los vectores de suministro que contienen el casete de expresión de CYP4V2 a las células, tejido u órgano diana del tratamiento, por ejemplo, RPE, fotorreceptores, coroides, córnea, linfocitos, la retina o el ojo, del sujeto. En algunos casos, el tratamiento puede aplicarse *in vitro* en las células diana (por ejemplo, células iPS-RPE del paciente, células iPS-fotorreceptoras del paciente, células progenitoras de iPS-fotorreceptoras, iPS-CEC, linfocitos). Después, las células tratadas se pueden trasplantar a un sujeto que lo necesite (por ejemplo, un paciente con BCD). En algunos casos, el tratamiento puede aplicarse combinando los enfoques tanto *in vivo* como *in vitro*. En algunos casos, la terapia génica con CYP4V2 puede usarse independientemente. En algunos casos, la terapia génica con CYP4V2 puede usarse con otra opción de tratamiento.

Los sujetos que son candidatos para los presentes métodos de tratamiento incluyen aquellos a los que se les diagnostica BCD. También se pueden tratar usando los métodos descritos en el presente documento sujetos que padecen otras afecciones oftalmológicas clínicamente definidas (por ejemplo, degeneración retiniana hereditaria (IRD), retinitis pigmentosa (RP) o distrofia corneal) provocadas por mutaciones en el gen CYP4V2. Un diagnóstico de BCD, IRD, RP, distrofia corneal u otra afección oftalmológica provocada por mutaciones en el gen CYP4V2 puede realizarse usando métodos conocidos en la técnica. Los métodos descritos en el presente documento pueden incluir identificar un sujeto, por ejemplo, un sujeto niño, adolescente o adulto, que tiene BCD u otra afección oftalmológica provocada por mutaciones en el gen CYP4V2, o que se sospecha que tiene BCD u otra afección oftalmológica provocada por mutaciones en el gen CYP4V2 (por ejemplo, basándose en la presencia de síntomas de la afección y no otra causa obvia), y obtener una muestra que comprende ADN genómico del sujeto, detectar la presencia de mutaciones en el gen CYP4V2 usando métodos de biología molecular conocidos.

Se han identificado numerosas mutaciones en el gen CYP4V2 que provocan BCD, con al menos una mutación en cada uno de los 11 exones del gen. El análisis de genotipo ha demostrado que la mutación de CYP4V2 más común entre los pacientes con BCD es c.802-8_810del17insGC (que se refiere a una delección de 17 bases con dos bases (GC) insertadas en el lugar que comienza a 8 bases del final del intrón 6 del gen CYP4V2, también denominada IVS6-8 del/insGC; esta mutación de inserción-delección está en la unión del intrón 6-exón 7 y la delección de 17 pb incluye el sitio aceptor de corte y empalme del exón 7, conduciendo a una delección en fase del exón 7 que codifica 62 aminoácidos, dando como resultado la omisión del exón 7. (Xiao *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.* 409:181-6, 2011; Meng *et al.*, 2014, *Mol. Vis.*, 20:1806-14; Wada *et al.*, *Am J Ophthalmol.* 139:894-9, 2005; Jiao *et al.*, *European Journal of Human Genetics* (2017) 25, 461-471). Se encontraron diversos tipos de mutaciones en CYP4V2 asociadas a BCD, incluyendo, pero sin limitación, sentido erróneo, sitio de corte y empalme, desplazamiento de marco, delección, inserción, indel, sin sentido, polimorfismos (por ejemplo, polimorfismos de un solo nucleótido) y terminación prematura. En la Tabla 1 se proporciona un resumen de mutaciones de CYP4V2 selectas entre pacientes humanos con BCD y se puede encontrar en diversas publicaciones y bases de datos en línea, por ejemplo, LOVD (databases.lovd.nl/shared/genes/CYP4V2 en la World Wide Web), OMIM (omim.org/allelicVariant/608614 en la World Wide Web) y ClinVar ([ncbi.nlm.nih.gov/clinvar?term=608614\[MIM\]](http://ncbi.nlm.nih.gov/clinvar?term=608614[MIM]) en la World Wide Web).

Cabe señalar que las mutaciones de CYP4V2 humano en la Tabla 1 no son exhaustivas. Es posible que se identifiquen más mutaciones de CYP4V2 en el futuro. Se entenderá que no todas las variaciones de la secuencia de referencia son mutaciones. Algunas variaciones no son patológicas. Se conocen en la técnica métodos para confirmar si una variación genética es patológica, es decir, una mutación, incluyendo, pero sin limitación, comparar la variación con mutaciones conocidas previamente identificadas clínicamente y/o determinar si existe una alteración correspondiente en la función. Por ejemplo, un método para determinar si una variación genética es una

variación patológica (es decir, una mutación) es someter a ensayo las funciones bioquímicas de la estirpe celular iPS-RPE derivada del sujeto como se describe en el presente documento y evaluar si existe alguna anomalía en comparación con la estirpe celular iPS-RPE de controles sanos.

5 Los pacientes con BCD u otra afección oftalmológica debida a mutaciones de CYP4V2 que pueden tratarse usando un método descrito en el presente documento preferentemente conservan algunos fotorreceptores y la función visual, por ejemplo, medidos mediante la agudeza visual, el campo visual, la función visual y/o Tomografía de Coherencia Óptica (OCT, por sus siglas en inglés, por ejemplo, Dominio espectral-OCT (SD-OCT)).

10 Antes de la administración, el producto final se someterá a una serie de etapas (por ejemplo, ultrapurificación) para cumplir los criterios de grado clínico. Las producciones de grado clínico están disponibles en el mercado a través de diversas instalaciones de GMP (buenas prácticas de fabricación, por sus siglas en inglés), incluyendo, sin limitación, las instalaciones del Programa de Recursos de Terapia Génica (GTRP) de los NIH y las organizaciones de fabricación por contrato (CMO).

15 Antes de la administración, se puede someter a ensayo el sujeto para detectar anticuerpos neutralizantes (NAb) preexistentes contra el tipo de vector de AAV cuya administración va a recibir el sujeto. En una realización, si el sujeto tiene NAb preexistente contra dicho tipo de AAV, puede usarse un vector de AAV alternativo con baja reactividad cruzada con el NAb preexistente del sujeto o un vector de AAV con estructura de cápside modificada para la administración a dicho sujeto para reducir las reacciones inmunitarias y conservar suficiente eficiencia de transducción por el vector de AAV. Se conocen en la técnica otros métodos para minimizar la respuesta inmunitaria, incluyendo, sin limitación, aplicar agentes y protocolos inmunosupresores antes, durante y/o después del tratamiento.

25 Pueden suministrarse vectores víricos o no víricos, o combinaciones de los mismos (por ejemplo, vectores híbridos), en células oculares de un sujeto usando uno o más medios físicos. Las células oculares como se usan en el presente documento se refieren a, sin limitación, células del epitelio pigmentario retiniano (RPE), células fotorreceptoras, células del epitelio corneal, células retinianas, células retinianas bipolares, células de bastón, células de cono, células ganglionares, células coroideas y/o células del cristalino. Además, o como alternativa, los vectores pueden suministrarse en células cercanas o vecinas o en células que pueden entrar en contacto con las células diana, incluyendo, sin limitación, células del cerebro o células del nervio óptico o células sanguíneas.

El tratamiento *in vitro* puede usar cualquier método o una combinación de métodos y/o agentes que administre eficazmente un vector a la célula diana del tratamiento (por ejemplo, una célula iPS-RPE de un paciente con BCD).
35 El tratamiento *in vitro* puede realizarse a través de una o más rondas de infecciones. En algunos casos, los vectores se aplican en células cultivadas directamente para transfectar o transducir las células. En algunos casos, pueden usarse otros métodos de suministro y/o potenciación de la eficiencia de transfección/transducción en células, incluyendo, sin limitación, múltiples transfecciones/transducciones, electroporación, magnetofección o sonoporación. Se conocen en la técnica métodos y agentes utilizados para infectar/transfectar una célula con un vector o un casete de expresión, incluyendo, sin limitación, como se describen en la sección de Ejemplos del presente documento.

Las células tratadas *in vitro* después se pueden trasplantar al ojo del sujeto. Por ejemplo, las células iPS-RPE reparadas genéticamente de un paciente con BCD se pueden trasplantar al paciente mediante inyección subretiniana. Se conocen en la técnica métodos, agentes y dispositivos utilizados en el trasplante de células al ojo, véase, por ejemplo, Wert *et al.*, *J Vis Exp.* 2012; (69): 4286; el documento WO 2016/179496; Schwartz *et al.*, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* Abril de 2016, Vol. 57, ORSFc1-ORSFc9.

Para el tratamiento *in vivo*, el vector y/o el casete de expresión se pueden suministrar a las células diana del tratamiento *in vivo* (por ejemplo, mediante suministro al ojo de un sujeto que necesita tratamiento para su suministro a las células diana del tratamiento). Se conocen en la técnica métodos de suministro de una molécula de ácido nucleico, un casete de expresión, un vector para una célula ocular diana *in vivo*. Por ejemplo, la administración al ojo puede usar cualquier método (o una combinación de métodos y/o agentes) que suministre eficazmente un vector a la retina, el espacio subretiniano, la coroides o generalmente al segmento posterior del ojo, la córnea, el cristalino o el vítreo, dependiendo de las células diana del tratamiento. La administración puede realizarse a través de cualquier medio adecuado, incluyendo, sin limitación, inyección (por ejemplo, inyección subretiniana, inyección intravítrea, inyección retiniana directa, inyección directa en el espacio supracoroideo posterior del ojo), colirios y se pueden aplicar en combinación con otras técnicas de suministro (por ejemplo, suministro asistido eléctricamente al epitelio corneal). También se pueden introducir en las células ácido nucleico, casete de expresión y/o vector de suministro de CYP4V2 usando, por ejemplo, bombardeo de partículas de ADN (por ejemplo, mediante un cañón génico), transferencia génica hidrodinámica, colirios, electroporación, magnetofección o sonoporación. Se conocen en la técnica métodos y técnicas de administración y suministro al ojo. Simplemente a modo de ejemplo, véase, sin limitación, Wert *et al.*, *J Vis Exp.* 2012; (69): 4286; el documento WO 2016/179496; Mohan *et al.*, *Prog. Retin Eye Res.* Enero de 2012; 31(1): 43-64.

Además del suministro convencional a las células RPE usando inyección subretiniana, un aspecto de los métodos

analizados en el presente documento es el suministro intravítreo de la molécula de ácido nucleico (por ejemplo, que tiene una secuencia de ácido nucleico de CYP4V2 no mutante) para el tratamiento o la prevención de una enfermedad ocular. Algunos vectores (por ejemplo, AAV2 (quadY-F+T-V) y AAV 7m8) se muestran particularmente prometedores para una transducción eficiente en la retina mediante administración intravítrea. Asimismo, los AAV u otros vectores víricos pueden modificarse mediante técnicas conocidas en la técnica que incluyen, por ejemplo, "evolución dirigida" y "diseño racional" para mejorar u optimizar su idoneidad como vectores para el suministro de genes a uno o más tipos de células o tejidos (por ejemplo, inyección intravítrea) de forma distinta a la inyección subretiniana convencional. Los vectores de scAAV también pueden usarse en el suministro intravítreo además del suministro subretiniano debido a su perfil de expresión rápido y sólido. Debido a que CYP4V2 se distribuye casi ubicuamente con una expresión particularmente alta en la retina, las alteraciones genéticas y epigenéticas de CYP4V2 son particularmente adecuadas para la reparación mediante la administración intravítrea de uno o más vectores. Los métodos de terapia génica actuales generalmente requieren la administración subretiniana del vector. Por lo tanto, uno de los avances técnicos logrados por los materiales y métodos divulgados en el presente documento es el suministro intravítreo de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre o no mutante, o secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de edición génica) y/o un polipéptido para tratar y prevenir enfermedades del ojo asociadas a alteraciones genéticas o epigenéticas en la secuencia de ácido nucleico de CYP4V2.

Pueden usarse determinadas técnicas y agentes para facilitar el proceso de administración o suministro. Los ejemplos no limitantes incluyen el uso de un agente lubricante de manera que se evite la adherencia del vector al vehículo de suministro (por ejemplo, una aguja). Asimismo, el uso de fármacos inmunosupresores antes, durante y/o después del proceso de administración o suministro puede aumentar la eficiencia de infección o transducción.

Se puede formular un vector para su suministro en células oculares de un sujeto usando diversos excipientes, diluyentes y/o portadores farmacéuticos y/o fisiológicamente aceptables. Los ejemplos de excipientes de vehículo, diluyentes y/o portadores adecuados para la administración al ojo, que pueden denominarse portadores farmacéuticamente aceptables, incluyen agua estéril apirógena y solución salina tamponada estéril apirógena (por ejemplo, solución salina tamponada usando fosfato u otros tampones tales como HEPES para mantener el pH a niveles fisiológicos adecuados), solución isotónica de cloruro de sodio, solución salina equilibrada, emulsiones (por ejemplo, emulsiones aceite/agua) y diversos tipos de agentes humectantes. En algunos casos, la formulación puede incluir otros agentes medicinales, agentes farmacéuticos, agentes estabilizantes, tampones, portadores, adyuvantes y diluyentes. En algunos casos, la formulación puede incluir DBPS, glicerol o Tween20 para el almacenamiento a largo plazo.

Los expertos en la materia conocen los métodos para determinar los medios de administración más eficaces y las dosis terapéuticamente eficaces y variarán con el vector, su estructura de cápside, el diseño del vector (por ejemplo, ssAAV frente a scAAV), la composición del casete de expresión, los niveles de expresión del vector, el promotor, otras secuencias reguladoras o la molécula de ácido nucleico, el título del vector, el tipo de célula diana, los niveles de expresión objetivo, el tamaño del área o el número de células diana y el sujeto que se está tratando (por ejemplo, la edad, el sexo, el peso, la fase de desarrollo de la enfermedad y el estado del sujeto que se ha de tratar, y posibles reacciones inmunitarias); la vía de administración; la ubicación de las células diana del tratamiento (por ejemplo, retina frente a córnea); la naturaleza y el nivel de expresión del gen pertinente en células y/o tejidos de tipo silvestre; y la pauta necesaria. Las dosis terapéuticamente eficaces pueden determinarse y evaluarse en modelos de enfermedad (por ejemplo, modelo celular de BCD (por ejemplo, estirpe celular iPS-RPE de pacientes con BCD) o un modelo animal, y confirmarse o refinarse mediante ensayos clínicos. Para el tratamiento de células *in vitro*, la dosis por lo general se expresa como MOI y después se multiplica la MOI por el número de células que se están tratando. La MOI generalmente varía entre aproximadamente 1×10^3 GC y aproximadamente 1×10^6 GC por célula o una MOI infecciosa de aproximadamente 100 a aproximadamente 10.000 GC por célula (GC: copias genómicas, que miden partículas de AAV que contienen genoma (también conocidas como genoma de vector (vg) o partículas de genoma (gp)). Para el tratamiento *in vivo*, además de las formulaciones descritas anteriormente, la dosis real administrada también puede verse afectada por situaciones individuales específicas de cada paciente durante la administración, por ejemplo, una dosis reducida durante la administración subretiniana para el paciente 6 en el caso de coroideremia que se describe a continuación. Por lo tanto, la dosis terapéuticamente eficaz para una administración única *in vivo* puede ser del orden de aproximadamente 1×10^6 a 2×10^{13} GC, inclusive (por ejemplo, un intervalo de dosis alta de aproximadamente 1×10^{11} GC a aproximadamente 1×10^{12} GC, un intervalo de dosis media de aproximadamente 1×10^{10} GC a aproximadamente 1×10^{11} GC, un intervalo de dosis baja de aproximadamente 1×10^9 GC a aproximadamente 1×10^{10} GC, un intervalo de dosis muy baja de aproximadamente 1×10^6 GC a aproximadamente 1×10^9 GC, y un intervalo de dosis muy alta de aproximadamente 1×10^{12} GC a aproximadamente 2×10^{13} GC), o cualquier dosis dentro estos intervalos que es suficiente para proporcionar el efecto deseado. En una realización, la composición se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^6 a 2×10^{13} GC. En otra realización, la dosis administrada *in vivo* se determina multiplicando el número de células diana del tratamiento por la MOI diana (por ejemplo, de 1×10^3 GC a aproximadamente 1×10^6 GC por célula). El volumen del agente que contiene los vectores de rAAV en cualquier administración única al ojo puede variar de aproximadamente 1 μ l (0,001 ml) a aproximadamente 1000 μ l (1 ml).

Las composiciones como se describen en el presente documento se pueden formular como una dosis única o una pluralidad de dosis. De forma similar, la administración puede producirse una vez o varias veces (por ejemplo, durante varias semanas, meses o años) y puede aplicarse en el mismo ojo o en el ojo contralateral. En circunstancias de administraciones múltiples, se pueden considerar serotipos iguales o diferentes de AAV y/o una o más vías de administración. La administración también puede aplicarse para tratar diferentes tejidos y células, por ejemplo, una administración dirigida al RPE y otra administración dirigida a la córnea.

Los expertos en la materia conocen métodos de generación de vectores víricos, producción con GMP, purificación, formulación y dosis para su uso en terapia génica (incluyendo terapia génica ocular), y los métodos de preparación de vectores víricos pueden ser realizados por cualquiera de una serie de empresas y métodos como se demuestra en los estudios de terapia génica de diversos grupos para LCA-2 a continuación. Los casetes de expresión proporcionados en el presente documento se pueden insertar en cualquiera de los vectores víricos de ejemplo que se enumeran a continuación. Como alternativa, se pueden generar vectores víricos basándose en los ejemplos que se proporcionan a continuación. Véase, Bainbridge *et al.*, 2008. *N Engl J Med.* 358:2231-9; Maguire *et al.*, 2008. *N Engl J Med.* 358:2240-8; Hauswirth *et al.*, *Hum Gene Ther.* Octubre de 2008; 19(10): 979-990.

Por ejemplo, en el estudio de Bainbridge, se usó el vector tgAAV76, un vector de virus adenoasociado recombinante de serotipo 2, para el suministro de genes. El vector contiene la secuencia codificante de RPE65 humano impulsada por un promotor RPE65 humano y terminada por el sitio de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, como se describe en otra parte. El vector fue producido por Targeted Genetics Corporation de acuerdo con las directrices de buenas prácticas de fabricación con el uso de una estirpe celular empaquetadora B50, un vector reordenado híbrido de virus de adenovirus-virus adenoasociado que contiene el genoma del vector tgAAV76 y un virus auxiliar de adenovirus 5. El vector se cargó en una solución salina tamponada con un título de 1×10^{11} partículas de vector por mililitro y se congeló en alícuotas de 1 ml a -70°C .

Maguire usó el vector vírico recombinante AAV2.hRPE65v2, que es un vector de AAV con replicación deficiente que contiene ADNc de RPE65 y que se ha documentado que proporciona restablecimiento a largo plazo, sostenido ($>7,5$ años, con observación continua) de la función visual en un modelo canino de LCA2 después de una única inyección subretiniana de AAV2.RPE65. El plásmido cis utilizado para generar AAV2.RPE65 contiene el gen de resistencia a la kanamicina. El virus fue fabricado por el The Center for Cellular and Molecular Therapeutics después de una triple transfección de células HEK293 y se aisló y purificó mediante microfluidización, filtración, cromatografía de intercambio catiónico (POROS 50HS; GE Healthcare, Piscataway, N.J.), ultracentrifugación en gradiente de densidad y diafiltración en PBS. Esta combinación proporciona una pureza óptima del producto del vector de AAV, incluyendo la eliminación eficiente de cápsides vacías y cloruro de cesio residual. Una porción del producto se suplementó con PF68 NF Prill Poloxámero 188 (PF68; BASF, Ludwigshafen, Alemania) para evitar pérdidas posteriores de vector en las superficies de contacto del producto. El virus purificado, con o sin PF68, después se hizo pasar a través de un filtro de $0,22 \mu\text{m}$ usando una jeringa estéril de 60 ml y un filtro de jeringa, y se almacenó congelado (-80°C) en tubos estériles hasta su uso. En el espacio subretiniano se administró una inyección de $1,5 \times 10^{10}$ genoma de vector de AAV2.hRPE65v2 en un volumen de $150 \mu\text{l}$ de solución salina tamponada con fosfato suplementada con Pluronic F-68 NF Prill Poloxámero 188.

El vector vírico utilizado por Hauswirth fue un vector de virus adenoasociado recombinante de serotipo 2 (rAAV2), alterado para portar el gen humano RPE65 (rAAV2-CB^{SB}-hRPE65), que previamente se había demostrado que restablece la visión en modelos animales con deficiencia de RPE65. El vector vírico RPE65-LCA se suministró mediante inyección subretiniana ($5,96 \times 10^{10}$ genomas de vector en $150 \mu\text{l}$).

En la técnica se conocen métodos y protocolos de administración de agentes terapéuticos (por ejemplo, proteína, molécula de ácido nucleico, casetes de expresión, vectores de terapia génica, células), incluyendo, sin limitación, al ojo y otros procedimientos y protocolos (incluyendo, sin limitación, ensayos de inmunología, exámenes oculares e inmunosupresores). Por ejemplo, el siguiente es un ejemplo de inyección subretiniana de vectores de AAV utilizados por MacLaren en el tratamiento de la coroideremia. En primer lugar, se realizó una cirugía para desprender la retina a través de una cánula de teflón 41G (DORC International BV, Zuidland, Países Bajos) usando una solución salina equilibrada (Alcon Laboratories, Fort Worth, TX, EE.UU.). Una vez que el área diana de la retina se había desprendido del epitelio pigmentario retiniano subyacente, se inyectó un volumen fijo ($0,1 \text{ ml}$) que contenía 1×10^{10} partículas de genoma de AAV2.REP1 a través de una jeringa nueva en el espacio subretiniano que se había creado en los primeros cinco pacientes. En el paciente 6, se inyectó una dosis reducida de hasta 6×10^9 partículas de genoma. El vector se inyectó lentamente a través de la misma retinotomía, provocando que el desprendimiento se extendiese aún más. La cirugía no fue complicada en los primeros cinco pacientes, pero en el paciente 6, la dificultad en el desprendimiento de la retina de la mácula periférica requirió la inducción del desprendimiento desde un punto cercano a la fóvea, lo que provocó un estiramiento visible del haz papilomacular. Debido a las preocupaciones sobre el daño relacionado con el estiramiento de esta estructura vital en un paciente con visión 6/7-5, en la segunda etapa se inyectó un volumen menor de vector (máximo $0,06 \text{ ml}$). En todos los pacientes, el vector sobrante que quedó en la jeringa se expulsó a través de la cánula a un vial de polipropileno y después se congeló. Posteriormente se sometió a ensayo la potencia de este vector excedente con transferencia Western después de la transducción de la estirpe celular HT1080 de origen humano. Se trató a los pacientes con un ciclo oral de 10 días de prednisolona, comenzando 2 días antes de la cirugía a 1 mg/kg ($70\text{-}100 \text{ mg}$) durante 7

días y después se redujo a 40 mg durante 1 día, 20 mg durante 1 día y 10 mg durante 1 día. Se tomaron muestras de sangre para ensayos inmunológicos antes, 1 semana y 5-6 semanas después de la cirugía. Véase MacLaren *et al.*, *Lancet*. 29 de marzo de 2014; 383(9923): 1129-1137.

En el estudio de Hauswirth, la administración se realizó de la siguiente manera. Después de una sedación intravenosa leve, el ojo quirúrgico recibió anestesia retrobulbar y después se preparó y cubrió de manera estéril convencional. Se realizó una vitrectomía periférica y central de calibre 23 con tres puertos convencional. La conjuntiva sobre la esclerotomía del lado derecho se disecó con tijeras de Westcott y fórceps de 0,3. La hemostasia se mantuvo mediante cauterización con punta de borrador. La esclerotomía se amplió con una hoja MVR de calibre 20 para que la cánula subretiniana pudiera insertarse fácilmente en el ojo. El vector se introdujo en una cánula de inyección de calibre 39 (Synergetics, O'Fallon, MO) y se introdujo en el espacio subretiniano. Al final del procedimiento, los sitios de esclerotomía se aseguraron con suturas de Vicryl 7.0 y la conjuntiva se cerró con suturas discontinuas. Se administraron antibióticos y esteroides subconjuntivales. Se usaron antibióticos y esteroides tópicos durante 20 días después de la cirugía. Véase, Hauswirth *et al.*, *Hum Gene Ther*. Octubre de 2008; 19(10): 979-990.

Para el tratamiento de terapia génica con CYP4V2 *in vitro*, la evaluación posterior al tratamiento puede comparar la morfología celular y/o las disfunciones bioquímicas de las células del paciente, por ejemplo, comparar los niveles de los compuestos mostró anomalías en las células iPS-RPE del paciente con BCD (o células iPS-PRC o iPS-CEC, si corresponde) antes y después del tratamiento, para evaluar si la morfología y/o la función bioquímica de las células ha mejorado después del tratamiento.

Para el tratamiento de terapia génica con CYP4V2 *in vivo*, la evaluación posterior al tratamiento puede usar exámenes oculares y de retina (y ensayos corneales, si corresponde) conocidos en la técnica para enfermedades retinianas y corneales, incluyendo, sin limitación, la adaptación a la oscuridad, la sensibilidad al contraste, el ensayo de campo visual, el ensayo de agudeza visual, el ensayo de visión de color, ERG, TCO, imágenes del fondo de ojo, el examen de córnea, ensayos funcionales tales como movilidad, etc. La eficacia puede verificarse mediante uno de los siguientes: visión mejorada, parada de la progresión de la enfermedad o velocidad de degeneración de la retina o pérdida de visión más lenta de lo esperado.

Un desafío de la terapia génica mediada por vectores víricos son las respuestas inmunitarias del sujeto que recibe la terapia génica. Además de los riesgos convencionalmente asociados al sujeto, las respuestas inmunitarias pueden reducir significativamente la eficiencia de transducción de los vectores víricos y/o provocar un fracaso en el establecimiento de la expresión transgénica a largo plazo. Mingozi F, Meulenberg JJ, Hui DJ, Basner-Tschakarjan E, Hasbrouck NC, Edmonson SA, Hutnick NA, Betts MR, Kastelein JJ, Stroes ES, High KA, AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood*. 3 de septiembre 2009; 114(10):2077-86.

Quizás, en parte debido al entorno inmunitario único del ojo, los efectos inmunitarios de diversos vectores víricos recombinantes (por ejemplo, AAV, lentivirus, adenovirus) en la terapia génica ocular parecen ser bastante benignos. No obstante, se puede desarrollar una respuesta inmunitaria mediada por células significativa después de la administración intraocular de adenovirus. Ni AAV ni lentivirus, sin embargo, desencadenan una respuesta mediada por células y, por lo tanto, son vectores prometedores para el tratamiento de enfermedades oculares (retinianas) crónicas. J Bennett, *Immune response following intraocular delivery of recombinant viral vectors, Gene Therapy* (2003) 10, 977-982. doi:10.1038/sj.gt.3302030. Por otra parte, sin embargo, un estudio anterior demostró que la administración intravítrea de vectores de AAV dio como resultado un aumento en los niveles de anticuerpos anti-AAV tanto en el líquido vítreo como en el suero de primates no humanos. Por otro lado, la presencia de títulos de anticuerpos neutralizantes preexistentes en el suero de los monos se correlacionó fuertemente con una expresión débil, en decadencia o nula del transgén después de la administración intravítrea de AAV. Kotterman *et al.*, *Antibody Neutralization Poses a Barrier to Intravitreal Adeno-Associated Viral Vector Gene Delivery to Non-Human Primates, Gene Ther*. Febrero de 2015; 22(2): 116-126. Por lo tanto, es deseable reducir las respuestas inmunitarias en la terapia génica ocular, especialmente las de anticuerpos neutralizantes (NAb), para conservar la eficiencia de transducción deseada y/o la expresión transgénica a largo plazo.

Históricamente, una práctica común para las empresas en el campo de la terapia génica ha sido usar el vector de AAV de un serotipo. Normalmente usa un tipo de vector con buena eficiencia de transducción y una gran cantidad de datos de seguridad en estudios con animales y/o ensayos clínicos de otras terapias génicas. Por ejemplo, AAV2 es el serotipo de AAV más utilizado para la terapia génica ocular en ensayos clínicos. Sin embargo, el mejor serotipo para un paciente no siempre es el mejor para otro paciente debido a las diferencias individuales en el sistema inmunitario, por ejemplo, anticuerpos anti-AAV preexistentes. Por ejemplo, la prevalencia de anticuerpos neutralizantes anti-AAV preexistentes contra serotipos específicos de AAV es diferente entre países y poblaciones. Asimismo, las reacciones inmunitarias pueden reducir significativamente la eficiencia de la transducción, lo que puede reducir la eficiencia de la terapia génica que se está aplicando y/o requerir la administración de una dosis más alta.

En el presente documento se proporciona un método para reducir las respuestas inmunitarias a vectores víricos,

conservar la eficiencia de transducción, para reducir la dosis del vector vírico y/o del inmunosupresor, y/o para maximizar el efecto terapéutico en diferentes pacientes para la misma enfermedad genética, en la terapia génica mediada por vectores víricos, que comprende:

- 5 (a) establecer un conjunto de más de un vector vírico recombinante (por ejemplo, rAAV) con suficiente eficiencia de transducción en el tipo de célula diana para la terapia génica. El conjunto de vectores víricos se puede ampliar creando variantes con mutaciones de la región antigénica u otras mutaciones o variantes en las cápsides de dichos vectores víricos después de que dichas mutaciones o variantes se confirmen con suficiente eficiencia de transducción en células diana pertinentes para la enfermedad (por ejemplo, en estirpes celulares
10 iPS-RPE o RPE para terapia génica con CYP4V2 para la BCD).
- (b) detectar anticuerpos neutralizantes anti-vectores víricos (NAb) preexistentes contra diferentes serotipos de vectores víricos y/o mutaciones o variantes de la cápside en el sujeto que necesita la terapia génica, y/o someter a ensayo y comparar diferentes vectores víricos en células diana de enfermedades específicas de paciente (por ejemplo, células iPS-RPE) derivadas de dicho sujeto.
- 15 (c) seleccionar un vector vírico de dicho conjunto de vectores víricos con (i) suficiente eficiencia de transducción en las células diana de la enfermedad y (ii) baja reactividad cruzada con los NAb preexistentes en el sujeto, y/o (iii) buen resultado de rescate de fenotipo en células diana de la enfermedades específicas de paciente del sujeto (por ejemplo, estirpes celulares iPS-RPE o RPE específicas de paciente para la terapia génica con CYP4V2 para la BCD), en donde dicho conjunto de vectores víricos comprende diferentes serotipos y/o
20 vectores víricos con cápside modificada (por ejemplo, incluyendo, sin limitación, AAV mutantes de la cápside y/o AAV variantes de la proteína de la cápside).
- (d) usar el vector vírico seleccionado de (c) para la administración al sujeto.
- (e) repetir (b) a (d) (solo la parte relacionada con los NAb preexistentes) anteriores cada vez que el sujeto requiere una administración de terapia génica, incluyendo, sin limitación, una administración de seguimiento al
25 mismo órgano (por ejemplo, un ojo o un ojo contralateral), o a otro órgano.

Los beneficios potenciales de este método incluyen un uso reducido de inmunosupresores, dosis más baja de vectores de rAAV, mayor eficiencia de transducción y expresión transgénica a más largo plazo y/o mayor porcentaje de pacientes elegibles para la terapia génica.

Se apreciará que este método puede usarse en conexión con otros vectores víricos. Asimismo, este método puede usarse en todo tipo de terapia génica ocular y terapia génica no ocular, ya sea que se relacione con el gen CYP4V2 u otro u otros genes.

35 En la técnica se conocen métodos de detección de anticuerpos anti-AAV preexistentes. Vale la pena señalar que los anticuerpos anti-AAV incluyen tanto anticuerpos neutralizantes como anticuerpos no neutralizantes. En la técnica se conocen métodos para detectar anticuerpos neutralizantes anti-AAV preexistentes y otras respuestas inmunitarias a los AAV. Melvin Y Rincón *et al.*, *JMIR Res Protoc.* Abril-junio de 2016; 5(2): e102; Hauswirth *et al.*, *Hum Gene Ther.* Octubre de 2008; 19(10): 979-990. Aunque el efecto es más significativo con los anticuerpos
40 neutralizantes, incluso los anticuerpos no neutralizantes pueden desencadenar la eliminación del vector por parte del sistema inmunitario. Los anticuerpos no neutralizantes pueden detectarse mediante ELISA. Boutin S, Monteilh V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Montus MF, Masurier C, *Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors.* *Hum Gene Ther.* Junio de 2010; 21(6):704-12.

45 A menos que se definan de otro modo, todos los términos científicos y técnicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto habitual en la materia a la que pertenecen los métodos y composiciones de la materia. Además de las definiciones de términos que se proporcionan en el presente documento, también pueden encontrarse definiciones de términos comunes en biología molecular en
50 *Glossary of Genetics: Classical and Molecular*, Rieger *et al.*, 1991, 5.^a Ed, Springer-Verlag; en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, Eds., Suplemento de 1998, Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc.; en *Current Protocols in Cell Biology*, Bonifacino *et al.*, Eds., Suplemento de 1999, John Wiley & Sons, Inc.; y en *Current Protocols in Neuroscience*, Crawley *et al.*, Eds., Suplemento de 1999, John Wiley & Sons, Inc.

55 En el presente documento se describen métodos y materiales representativos; también pueden usarse otros métodos y materiales adecuados conocidos en la materia. Los métodos y materiales son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

60 EJEMPLOS

Las invenciones se describen con más detalle en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de las invenciones ni de las reivindicaciones.

65 Los estudios se iniciaron, se diseñaron, se organizaron y se patrocinaron por Reflection Biotechnologies Limited ("ReflectionBio"), una empresa de biotecnología fundada e impulsada por un paciente y una familia que padece una rara enfermedad de la retina. Los pacientes con enfermedades raras cargan con las inevitables probabilidades

de mutaciones genéticas para la humanidad, pero con frecuencia son ignorados por la sociedad y no reciben suficiente apoyo de los recursos públicos. Como empresa de biotecnología impulsada por un paciente, ReflectionBio aplica un enfoque '*Por Pacientes, Para Pacientes* para que los pacientes unan fuerzas y desempeñen una función más activa en el impulso de la I+D científica y médica sobre enfermedades raras y otras enfermedades desafiantes.

En este estudio se incluyeron pacientes diagnosticados con BCD y que tenían diferentes mutaciones de CYP4V2 bialélicas (incluyendo una mutación de CYP4V2 homocigótica o mutaciones de CYP4V2 heterocigóticas compuestas). En particular, un paciente (denominado en el presente Paciente 1, P1 o RB001) tiene la mutación c.802-8_810del17insGC homocigótica. La mutación c.802-8_810del17insGC da como resultado una delección en fase del exón 7 que codifica 62 aminoácidos. La mutación c.802-8_810del17insGC es la mutación más común entre los pacientes con BCD. El Paciente 2 (P2 o RB002) tiene mutaciones de CYP4V2 heterocigóticas compuestas, cada una de las mutaciones es un cambio de nucleótido único que da como resultado un solo cambio de aminoácido en la proteína CYP4V2 de 525 aminoácidos de longitud.

Se obtuvieron consentimientos informados. Los procedimientos siguieron las directrices de la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por una Junta de Revisión Institucional.

Ejemplos de modelos de enfermedades celulares humanas de BCD

Clínicamente, BCD se asocia a atrofia del RPE, lo que a su vez provoca la muerte de los fotorreceptores y la pérdida de la visión. Por lo tanto, es fundamental crear y usar un modelo de RPE humano para estudiar la BCD y desarrollar un tratamiento para la BCD.

Ejemplo 1 - Generación y caracterización de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) derivadas de pacientes con BCD

En el estudio, se usaron métodos sin integración para generar iPSC a partir de pacientes con BCD. Se integran tecnologías tradicionales utilizadas para la reprogramación de iPSC (por ejemplo, lentivirus, retrovirus) en el genoma de las células diana. Las iPSC y las células resultantes diferenciadas de las iPSC contendrán ADN extraño y podrían ser inseguras y problemáticas para su uso en aplicaciones de terapia celular y descubrimiento de fármacos. Además, la integración podría ocurrir en una región crítica del genoma, provocando problemas con procesos de desarrollo no relacionados. En comparación con los métodos de reprogramación tradicionales, los métodos de reprogramación sin integración generan iPSC que no contienen vectores o transgenes detectables, haciéndolos por lo tanto más adecuados para aplicaciones de terapia celular y descubrimiento de fármacos.

En el estudio, se usaron dos métodos diferentes de reprogramación sin integración para generar iPSC de pacientes con BCD, uno que emplea el virus Sendai, el otro emplea vectores episómicos. Se usaron dos tipos diferentes de muestras, una es una muestra de piel (fibroblastos cutáneos) y la otra es una muestra de sangre (células mononucleares de sangre periférica (PBMC)). Puede usarse cualquiera de los métodos para generar iPSC específicas de paciente con BCD a partir de piel, sangre u otras muestras, tales como muestras de orina y cabello.

A. Reprogramación de iPSC a partir de una muestra de piel

Se realizó una biopsia de piel en pacientes con BCD y de la biopsia se obtuvieron células de fibroblastos humanos. Después se reprogramaron células de fibroblastos específicas de paciente con BCD en estirpes celulares iPS usando el virus Sendai, un virus de ARN sin huellas que no conlleva ningún riesgo de alteración del genoma del hospedador. También pueden usarse otros vectores, incluyendo, sin limitación, lentivirus, en la reprogramación de iPS, pero con riesgo de integrarse en el genoma de la célula hospedadora. Véase la Figura 1 para consultar fotografías de células iPS derivadas de pacientes con BCD. También se reprogramaron células de fibroblastos de individuos sanos de la misma manera para generar estirpes celulares iPS de tipo silvestre (o de control).

Para generar iPSC, se sembraron en placa 5×10^4 fibroblastos y se cultivaron en placas de 12 pocillos hasta que las células se volvieron adherentes (durante aproximadamente 12 horas) y tenían aproximadamente un 70 %-80 % de confluencia. Se eliminó el medio de cultivo y las células se transfectaron con un virus Sendai que expresaba Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc (Kit de reprogramación CytoTune™-iPS 2.0 Sendai, A16517, Life Technologies) a una MOI de 5:5:3:5 en 500 µl de medio de cultivo de fibroblastos. Las células se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante la noche, después de lo cual se eliminó el medio que contenía el virus y se reemplazó con medio KO-DMEM (KnockOut DMEM, reemplazo de suero KnockOut al 15 %, L-glutamina 1, aminoácidos no esenciales 1, penicilina-estreptomycin 1, β-Mercaptoetanol 0,1 mM, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) 10 ng/ml). Las células transfectadas se incubaron durante aproximadamente 7 días, con cambio de medio todos los días.

Las células transfectadas se lavaron en PBS, se expusieron a tripsina (por ejemplo, TrypLE Express a 37 °C durante 4 minutos) y se resuspendieron en 2 ml de medio KO-DMEM que contenía inhibidor de ROCK 10 µM. Después, las células se sembraron en placas sobre una capa alimentadora de MEF tratada con mitomicina C y se

devolvieron a 37 °C y 5 % de CO₂. Después de 24 horas y todos los días siguientes, el medio se eliminó y se reemplazó con medio KO-DMEM (sin inhibidor ROCK). Las colonias fueron visibles 7-14 días después del pase. Cada colonia de iPS se microdisecionó en trozos de aproximadamente 100-150 células, después de un breve tratamiento con medio KO-DMEM con inhibidor de ROCK 10 µM, y después se cultivaron nuevamente en medio KO-DMEM a 37 °C y 5 % de CO₂ durante otra semana.

La caracterización de iPSC se realizó usando anticuerpos primarios de marcadores pluripotentes: poli de conejo OCT4 Santa Cruz sc-9081, IgG de ratón SOX2 R&D Systems 245610, MAB4381 TRA-1-60 Millipore (Chemicon), IgM de ratón, IgG de ratón SSEA4 Millipore (Chemicon) MAB4304, poli de cabra Nanog R&D Systems AF1997. Normalmente para la caracterización usando marcadores, las células se lavaron, se bloquearon (por ejemplo, con suero al 3 % y Triton X al 0,1 %), se expusieron a un anticuerpo primario (1:200) y se incubaron a temperatura ambiente durante 2-3 horas. Las células se lavaron nuevamente, se expusieron a un anticuerpo secundario y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después, las células se contratiñeron en el núcleo (por ejemplo, usando Dapi 1:10000 en PBST).

Véase la Figura 1 (a) para consultar iPSC generadas a partir de fibroblastos de pacientes con BCD y la caracterización por marcadores Oct-4, Sox-2, SSEA-4, Nanog y Tra-1-60,

B. Reprogramación de iPSC a partir de una muestra de sangre

Además de las muestras de biopsia de piel, también se generaron iPSC a partir de muestras de sangre de paciente con BCD y control sano. Las iPSC se generaron a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) usando un método episómico. El protocolo se describe a continuación.

Activación de linfocitos T:

a) Se descongelaron PBMC congeladas y aproximadamente 0,5 millones de células viables se sometieron a activación de linfocitos T usando Dynabeads (activador de T humanas, CD3/CD28, Thermo Fisher, n.º de cat. 11132D) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

b) Después, los linfocitos T activados se expandieron en medio de cultivo de células sanguíneas durante 10-14 días.

Reprogramación:

a) Para generar estirpes de iPSC, se disociaron los linfocitos T activados de las dynabeads y se sometieron a electroporación con vectores de reprogramación de iPSC episómicos (n.º de cat. A14703, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) usando el sistema de transfección Neon (n.º de cat. MPK10096) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

b) Los dos conjuntos de células electroporadas se sembraron en dos conjuntos de placas de 35 mm precultivadas con alimentadores CF1 MEF (n.º de cat.: ASF-1213, Applied StemCell, Milpitas, CA, EE.UU.). Las células se alimentaron a diario con medio de crecimiento de iPSC humanas.

c) Después de 2-3 semanas, se recogieron colonias de iPSC similares a ESC humanas y se transfirieron a placas de 24 pocillos recubiertas con matri-gel para su expansión.

d) Después se cultivaron estirpes de iPSC humanas específicas de paciente y se hicieron pases en Matrigel (n.º de cat. de Corning 354277) en medio de crecimiento sin alimentador de iPSC humanas (mTeSR™1, n.º de catálogo 05850, StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canadá) durante 2-3 pases más hasta obtener un número suficiente de células antes de la crioconservación.

Fosfatasa alcalina:

a) Para la tinción de fosfatasa alcalina (AP), las iPSC se fijaron y después se tiñeron con una solución de tinción de fosfatasa alcalina (Naftol/rojo violeta rápido, Sigma).

b) Las imágenes de células se capturan usando un microscopio Olympus (IX51, Olympus, Tokio, Japón).

Véase la Figura 1(b) para consultar imágenes de contraste de fase de iPSC generadas a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de muestras de sangre de un paciente con BCD y un control sano, y los resultados de la tinción de AP.

Véase la Figura 1 (c) para consultar imágenes de cariotipo de iPSC derivadas de pacientes con BCD que muestran un cariotipo humano aparentemente normal.

Ejemplo 2 - diferenciación de iPSC de pacientes con BCD en células del epitelio pigmentario retiniano (RPE)

La diferenciación de iPSC comenzó en los pases 3 a 6 para todas las estirpes de iPSC de pacientes con BCD y controles sanos. Para la diferenciación, las colonias de iPS se cultivaron hasta la confluencia en placas de cultivo de 6 pocillos (Costar, Corning, Corning, NY) pretratadas con Matrigel diluido 1:50 (CORNING, 356230) en medio

de diferenciación que consiste en Knock-Out (KO) DMEM (Thermo Fisher Scientific, 10829018), suero KO de reemplazo al 15 % (Thermo Fisher Scientific, 10829028), aminoácidos no esenciales al 1 % (Thermo Fisher Scientific, 11140050), glutamina 2 mmol/l (Thermo Fisher Scientific, 35050061), penicilina-estreptomicina 50 U/ml (Thermo Fisher Scientific, 10378016) y nicotinamida 10 mmol/l (Sigma-Aldrich, N0636) durante los primeros 14 días. Durante los días 15.º a 28.º de diferenciación, el medio de diferenciación se suplementó con Activina-A humana 100 ng/ml (PeproTech, 120-14). A partir del día 29, se eliminó la activina-A hasta que se completó la diferenciación. Después de 8-10 semanas, se formaron conglomerados pigmentados que se recogieron manualmente y se sembraron en placas recubiertas con Matrigel. Esas células se mantuvieron en medio de RPE a base de MEM (modificación alfa, Sigma-Aldrich, M-4526), que contiene suplemento N1 (5 ml por 500 ml de medio), Taurina (125 mg por 500 ml de medio), Hidrocortisona (10 µg por 500 ml de medio), Triiodotironina (0,0065 µg por 500 ml de medio) (todos de Sigma-Aldrich), glutamina 2 mmol/l, penicilina/estreptomicina 50 U/ml, aminoácidos no esenciales al 1 % y suero fetal bovino al 5 % (todos de GIBCO-BRL). Las células se cultivaron durante otras 6-8 semanas para permitirles formar una monocapa funcional para ensayos funcionales.

Las células RPE diferenciadas de las iPSC de los pacientes con BCD se observaron bajo microscopía óptica y se observó un pigmento de RPE distinto y formas de células hexagonales (Véase la Figura 2). Además de las distinciones morfológicas, las células RPE derivadas de iPS de pacientes con BCD también fueron validadas por la presencia de marcadores específicos de RPE, RPE65, CRALBP y MITF. Véase la Figura 2 (b) para consultar los resultados de los marcadores RPE de células iPS-RPE de pacientes con BCD, que muestran la presencia de marcadores específicos de RPE, RPE65, CRALBP y MITF.

Pueden usarse múltiples protocolos para diferenciar las iPSC en células RPE. El protocolo de diferenciación de RPE descrito en el presente documento es un protocolo ampliado que por lo general lleva más de 3 meses. Otros protocolos llevan menos tiempo, por ejemplo, menos de 2 meses. Aunque tanto los protocolos más cortos como los extendidos pueden diferenciar las iPSC en células RPE, puede haber diferencias en términos del riesgo de tumorigénesis entre las células iPSC-RPE generadas mediante diferentes protocolos. El riesgo de tumorigénesis asociado a la diferenciación de iPSC se atribuye a que una parte de las células iPS permanecen indiferenciadas o no totalmente diferenciadas al final del protocolo, y el protocolo extendido probablemente contribuye a la falta de formación de tumores porque las iPSC están totalmente diferenciadas en células RPE maduras. El protocolo a más largo plazo se usó para garantizar la pureza de las estirpes celulares iPS-RPE generadas para ensayos bioquímicos y de otro tipo y estudios funcionales, y para respaldar la seguridad de las células iPSC-RPE para la terapia celular, incluyendo, sin limitación, el trasplante autólogo.

Ejemplo 3 - Ensayos bioquímicos, de viabilidad celular y otros ensayos para el modelo celular de BCD y estudios funcionales de CYP4V2

Ensayos de lípidos:

Los estudios anteriores sobre BCD y la función de la enzima CYP4V2 se han centrado en los ácidos grasos. En este estudio, se usaron más ensayos de lípidos incluyendo no solo ácidos grasos sino también ceramidas (Cer), esfingomielinas (SM) y esfingosina y esfinganina (SOSA), para analizar las anomalías bioquímicas/fenotipo en el modelo de enfermedad de BCD y para analizar las funciones bioquímicas de la proteína CYP4V2.

Se realizaron ensayos bioquímicos en ácidos grasos libres (AGL), ceramidas (Cer), esfingomielinas (SM) y esfingosina y esfinganina (SOSA) en el Laboratorio Central de Biomarcadores de la Universidad de Columbia (Nueva York, NY, EE.UU.) basándose en sus ensayos y protocolos pertinentes.

Los ácidos grasos libres (AGL), ceramida, esfingosina y esfinganina se extrajeron usando cloroformo: metanol. Brevemente, se homogeneizaron aproximadamente 1 millón de células iPS-RPE en 150 µl de agua. Se mezclaron 100 µl de homogeneizado con 3 ml de cloroformo: metanol (v:v = 2:1) que contenía patrones internos (Ácido palmítico-D31, ceramida C12, ceramida C25, esfingosina C17, esfinganina C17). La muestra se agitó bien con formación de vórtice y se añadieron 0,5 ml de agua para permitir la separación de fases. La mezcla se agitó con formación de vórtice nuevamente y se centrifugó a 3.000 g durante 10 minutos a 4 °C. La fase orgánica inferior se transfirió a un segundo tubo de vidrio limpio usando una pipeta Pasteur. A la fase acuosa residual se le añadieron dos ml de cloroformo, seguido de mezcla con formación de vórtice y centrifugación nuevamente para extraer cualesquier lípidos restantes. Las fases orgánicas inferiores se reunieron y se evaporaron en atmósfera de nitrógeno a 37 °C. Los lípidos extraídos se reconstituyeron en 50 µl de metanol: acetónitrilo (v:v = 1:1) y se transfirieron a viales de automuestreador de CL para inyección. La esfingomielina también se extrajo con cloroformo: metanol como otros lípidos, pero solo se colocaron 2 µl de homogeneizado celular para la preparación de muestras para esfingomielina. Todos los ensayos se realizaron en un sistema Waters Xevo TQ EM ACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, EE.UU.). El AGL se eluyó mediante una columna Waters ACQUITY UPLC HSS C18 de 100 mm. Se separaron ceramida, esfingosina, esfinganina y esfingomielina en una columna Waters ACQUITY UPLC BEH Fenilo de 100 mm. El AGL se controló mediante el uso del método SIR negativo y otros mediante la obtención de MRM positiva.

En la Tabla 2 a continuación se proporciona una lista de compuestos sometidos a ensayo en los ensayos

bioquímicos. Se adquirieron determinados compuestos químicos para su uso como patrones en este estudio (como se anota en la Tabla 2. Nu-Chek: Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN, EE.UU.; Cayman: Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, EE.UU.). Otros compuestos usaron patrones existentes disponibles en el Laboratorio Central de Biomarcadores de la Universidad de Columbia (Nueva York, NY, EE.UU.). Todos los AGL se detectaron mediante EM única, mientras que otros tipos de compuestos se detectaron mediante EM/EM.

5

TABLA 2: LISTA DE COMPUESTOS DE ENSAYO					
Ácidos grasos (AGL)	Descripción	Proveedor	N.º de cat.	Ceramidas (Cer)	Descripción
C12	C12:0 (ÁCIDO LÁURICO)	Nu-Chek	N-12-A	C14	C14 Ceramida (d18:1/14:0)
C13	C13:0 (ÁCIDO TRIDECANOICO)	Nu-Chek	N-13-A	C16:1	C16:1 Ceramida (d18:1/16:1)
C14:1 Isómero 1				C16	C16 Ceramida (d18:1/16:0)
C14:1 Isómero 2				C18:1	C18:1 Ceramida (d18:1/18:1)
C14 Ácido mirístico	C14:0 (ÁCIDO MIRÍSTICO)			C18	C18 Ceramida (d18:1/18:0)

(continuación)

TABLA 2: LISTA DE COMPUESTOS DE ENSAYO					
C15	C15:0 (ÁCIDO PENTADECANOICO)	Nu-Chek	N-15-A	C20:5	C20:5 Ceramida (d18:1/20:5)
C16:1 n7 cis	Δ 9 cis (ÁCIDO PALMITOLEICO)	Nu-Chek	U-40-A	C20:4	C20:4 Ceramida (d18:1/20:4)
C16:1 n9 cis	Ácido cis-7-hexadecenoico	Cayman	10007290	C20:1	C20:1 Ceramida (d18:1/20:1)
C16:1 n7 trans	Δ 9 trans (ÁCIDO PALMITELAÍDICO)	Nu-Chek	U-41-A	C20	C20 Ceramida (d18:1/20:0)
C16 Ácido palmítico	C16:0 (ÁCIDO PALMÍTICO)			C22:6	C22:6 Ceramida (d18:1/22:6)
C17	C17:0 (ÁCIDO MARGÁRICO)	Nu-Chek	N-17-A	C22:5	C22:5 Ceramida (d18:1/22:5)
C18:3 n3 Alfa	C18:3n-3:(ÁCIDO ALFA LINOLÉNICO)	Nu-Chek	U-62-A	C22:1	C22:1 Ceramida (d18:1/22:1)
C18:3n6 Gama	C18:3n-6 (ÁCIDO GAMMA LINOLÉNICO)	Nu-Chek	U-63-A	C22	C22 Ceramida (d18:1/22:0)
C18:2 n6 9,12 cis	Δ 9 cis, 12 cis (ÁCIDO LINOLEICO)	Nu-Chek	U-59-A	C24:1	C24:1 Ceramida (d18:1/24:1)
C18:2 n6 9,12 trans	Δ 9 trans 12 trans (ÁCIDO LINOELAÍDICO)	Nu-Chek	U-60-A	C24	C24 Ceramida (d18:1/24:0)
C18:1 Ácido oleico	C18:1 n-9 (ÁCIDO OLEICO)			C26:1	C26:1 Ceramida (d18:1/26:1)
C18 Ácido esteárico	C18:0 (ÁCIDO ESTEÁRICO)			C26	C26 Ceramida (d18:1/26:0)
C19	C19:0 (ÁCIDO NO DECANOICO)	Nu-Chek	N-19-A	C28:1	C28:1 Ceramida (d18:1/28:1)
C20:5 n3 EPA	ÁCIDO EICOSAPENTAENOICO (EPA)	Nu-Chek	U-99-A	C28	C28 Ceramida (d18:1/28:0)
C20:4 n6 AA	ÁCIDO ARAQUIDÓNICO (AA)	Nu-Chek	U-71-A		
C20:4 Isómero				Esfingomielinas (SM)	
C20:3 n6	ÁCIDO LINOLÉNICO HOMOGAMMA	Nu-Chek	U-69-A	C14:1	C14:1 Esfingomielina (d18:1/14:1)
C20:3 Isómero 1				C14	C14 Esfingomielina (d18:1/14:0)
C20:3 Isómero 2				C16:1	C16:1 Esfingomielina (d18:1/16:1)
C20:2 n6	ÁCIDO EICOSADIENOICO 11-14	Nu-Chek	U-68-A	C16	C16 Esfingomielina (d18:1/16:0)
C20:2 Isómero				C18:1	C18:1 Esfingomielina (d18:1/18:1)
C20:1 n9	ÁCIDO 11-EICOSENOICO	Nu-Chek	U-66-A	C18	C18 Esfingomielina (d18:1/18:0)
C20 Ácido araquidónico	C20:0 (ÁCIDO ARAQUÍDICO)			C20:5	C20:5 Esfingomielina (d18:1/20:5)
C21	ÁCIDO HENEICOSANOICO	Nu-Chek	N-21-A	C20:4	C20:4 Esfingomielina (d18:1/20:4)
C22:6 n3 DHA	ÁCIDO DOCOSAHEXAENOICO (DHA)	Nu-Chek	U-84-A	C20:1	C20:1 Esfingomielina (d18:1/20:1)

(continuación)

TABLA 2: LISTA DE COMPUESTOS DE ENSAYO					
C22:5 n3 DPA	ÁCIDO DOCOSAPENTAENOICO 7-10-13-16-19	Nu-Chek	U-101-A	C20	C20 Esfingomielina (d18:1/20:0)
C22:5 n6	ÁCIDO DOCOSAPENTAENOICO 4-7-10-13-16	Nu-Chek	U-102-A	C22:6	C22:6 Esfingomielina (d18:1/22:6)
C22:4 n6	DOCOSATETRAENOICO 7-10-13-16	Nu-Chek	U-83-A	C22:5	C22:5 Esfingomielina (d18:1/22:5)
C22:1 n9	13-DOCOSENOICO (ERÚCICO)			C22:1	C22:1 Esfingomielina (d18:1/22:1)
C22	ÁCIDO BEHÉNICO	Nu-Chek	N-22-A	C22	C22 Esfingomielina (d18:1/22:0)
C23	ÁCIDO TRICOSANOICO	Nu-Chek	N-23-A	C24:1	C24:1 Esfingomielina (d18:1/24:1)
C24:1 n9	ÁCIDO NERVÓNICO	Nu-Chek	U-88-A	C24	C24 Esfingomielina (d18:1/24:0)
C24	ÁCIDO LIGNOCÉRICO	Nu-Chek	N-24-A	C26:1	C26:1 Esfingomielina (d18:1/26:1)
C25	ÁCIDO PANTACOSANOICO	Cayman	15197	C26	C26 Esfingomielina (d18:1/26:0)
C26:1	C26:1 n9 (Ácido hexacosanoico)			C28:1	C28:1 Esfingomielina (d18:1/28:1)
C26	ÁCIDO HEXACOSANOICO	Cayman	13354	C28	C28 Esfingomielina (d18:1/28:0)
SOSA					
so	Esfingosina (d18:1)				
SA	Esfinganina (d18:0)				
SO-1P	Esfingosina-1-fosfato (d18:1)				
SA-1P	Esfinganina-1-fosfato (d18:0)				

Ensayos de ácidos hidroxigrasos:

5 Asimismo, Se usó CL-EM/EM para detectar ácidos hidroxigrasos en células iPS-RPE, incluyendo 16-HEPE, 17-HEPE, 18-HEPE, 19-HEPE, 20-HEPE, 17-HDHA, 18-HDHA, 19-HDHA, 20-HDHA, 21-HDHA, 22-HDHA, 19(20)-EpDPA (nombre formal: ácido (±)19,20-epoxi-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-docosapentaenoico, también conocido como (±)19,20 EDP,

10 ácido (±)19,20-epoxi docosapentaenoico, (±)19,20-epoxi DPA, (±)19,20-EpDPE) y 19(20)-DiHDPA (nombre formal: ácido (±)19,20-dihidroxi-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-docosapentaenoico, también conocido como: (±)19,20-DiHDoPE). Los compuestos de HDHA son hidroximetabolitos de DHA y los compuestos de HEPE son hidroximetabolitos de EPA, respectivamente. 19(20)-EpDPA es un metabolito de la DHA epoxigenasa, derivado mediante epoxidación del doble enlace ω-3 del DHA. 19(20)-DiHDPA también es un metabolito de DHA. El DHA es un ácido graso importante y el ácido graso ω-3 más abundante para el cerebro y la retina. Una investigación previa indicó que

15 CYP4V2 es una hidroxilasa para ácidos grasos ω-3, particularmente DHA.

20 Materiales: se adquirieron patrones de ácidos hidroxigrasos (±)18-HEPE (n.º de artículo 32840), (±)20-HDHA (n.º de artículo 33750), (±)19(20)-EpDPA (n.º de artículo 10175) y (±)19(20)-DiHDPA (n.º de artículo 10007001) en Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI, EE.UU.). El patrón interno ácido palmítico deuterado (ácido graso C16-D31) se adquirió en C/D/N Isotopes Inc. (n.º D-2002, Quebec, Canadá).

Debe entenderse que, además de los métodos de CL-EM o CL-EM/EM descritos anteriormente, las especies

químicas y compuestos sometidos a ensayo en el estudio también pueden detectarse y/o cuantificarse mediante el uso de otros métodos. Por ejemplo, existen métodos de CG-EM o CG-EM/EM para AGL con pretratamiento de metilación. Para Cer y SM, puede usarse FIA-EM/EM o CG-EM/EM.

5 *Ensayo de viabilidad celular:*

Exposición a la luz azul: se sembraron células iPS-RPE en placas de 3,5 cm y en placas de cámara de 4 pocillos. Después de 2 meses, se expusieron a luz de 430 ± 20 nm (azul) a $1,5 \text{ mW/cm}^2$ durante 1 hora en PBS(+) que contenía glucosa $10 \mu\text{g/ml}$. Se usó la misma densidad de siembra para todas las estirpes celulares. Después de la exposición a la luz azul, las células tratadas se alimentaron con medio de RPE nuevo y se recuperaron en una incubadora con 5 % de CO_2 y 37°C durante la noche.

Además de 1 hora, pueden usarse duraciones de exposición a la luz más cortas o más largas, por ejemplo, sin exposición, 30 minutos, 45 minutos, 75 minutos, 90 minutos o 120 minutos, etc. De forma similar, también puede usarse la exposición a luz de una longitud de onda diferente o de un espectro más amplio. Por otro lado, pueden usarse muestras de iPS-RPE de diferentes días de cultivo (por ejemplo, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses o 6 meses en cultivo de RPE), por ejemplo, para estudiar el efecto del envejecimiento.

Ensayo de viabilidad celular: Las células vivas/sanas se marcaron con el colorante permeante celular Calceína AM (Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo: C3099, EE.UU.) a una concentración final de PBS(+) $3 \mu\text{mol/ml}$ (1 ml para cada placa de 3,5 cm o 200 μl para cada cámara) y las células muertas/enfermas se marcaron con Yoduro de propidio (PI) (Thermo Fisher Scientific, n.º de catálogo: P3566, EE.UU.) a una concentración final de PBS(+) $2 \mu\text{g/ml}$ (1 ml para cada placa de 3,5 cm o 200 μl para cada cámara) a temperatura ambiente durante 1 hora. Puesto que el PI se une al ADN y no es permeante para células vivas, se usa habitualmente para detectar células muertas en una población. A continuación, después de lavar con PBS(-), se observaron los niveles de fluorescencia celular y se tomaron fotografías con un microscopio de fluorescencia invertida (Nikon Eclipse Ts2R) con un aumento de 20 veces. Las relaciones de células muertas/vivas se calcularon después de que ImageJ (Fiji) procesara las fotografías.

Además de los ensayos bioquímicos y los ensayos de viabilidad celular, pueden realizarse ensayos de función del RPE en células iPS-RPE de pacientes con BCD, tales como actividad fagocítica, resistencia transepitelial.

Expresión de CYP4V2:

Se realizaron experimentos para detectar y comparar los niveles de expresión de CYP4V2 en células iPS-RPE específicas de paciente con BCD y de control. La expresión de CYP4V2 en estirpes celulares puede evaluarse mediante anticuerpo anti-CYP4V2 (transferencia Western Blot) o mediante PCR cuantitativa.

Transferencia Western CYP4V2: se ejecutaron 45 μg de proteína de células enteras de cada muestra de iPS-RPE en un gel de SDS page al 7,5 %, después se realizó transferencia en húmedo a una membrana. La membrana se bloqueó con BSA al 5 % en PBST durante 1 hora a temperatura ambiente y después se incubó con anticuerpo primario (Anti-CYP4V2 producido en conejo, n.º de catálogo de Sigma Aldrich: SAB 1410565, EE.UU.) a una concentración de 1:1000 en BSA al 5 % durante la noche a 4°C . El lavado se realizó durante 3×10 minutos con PBST. Después, la membrana se incubó con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo HRP (n.º de catálogo de Santa Cruz: sc-2004, EE.UU.) a una concentración de 1:3000 en BSA al 5 % durante 4 horas a 4°C . El lavado final se realizó durante 3×10 minutos con PBST. Como control de carga se usó GAPDH.

La transferencia Western de CYP4V2 detectó la expresión de la proteína CYP4V2 en las muestras de iPS-RPE de los controles, pero no en la muestra de iPS-RPE de pacientes con BCD. Después del tratamiento con AAV.CYP4V2, se detectó proteína CYP4V2 en muestras de iPS-RPE específicas de paciente con BCD.

PCR en tiempo real y cuantificación relativa de ARNm: Se recogieron muestras de iPS-RPE tratadas con AAV.CYP4V2 de controles sanos (TS), pacientes con BCD y pacientes con BCD y se lisaron con el reactivo TRIZOL (Invitrogen). Se aisló ARN total de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después se realizó un tratamiento con ADNasa I (Invitrogen) para evitar la contaminación de ADN genómico. La reacción de transcripción inversa se realizó mediante el kit de transcripción inversa Superscript III y se usó un hexámero aleatorio (Invitrogen) para generar ADNc. El método de PCR en tiempo real se realizó usando Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fisher Scientific) con el sistema de PCR en tiempo real StepOne (Invitrogen) para cuantificar los niveles de expresión génica (38 ciclos). Se usaron cebadores específicos de la región del exón 7 de CYP4V2 y de CYP4V2op, respectivamente. Se usó actina como gen constitutivo.

Resultados: Se realizó una PCR cuantitativa para someter a ensayo la expresión de CYP4V2 y CYP4V2op en muestras de células iPS-RPE. Los niveles de transcritos de CYP4V2 y CYP4V2op se normalizaron mediante una muestra de paciente y una muestra de control, respectivamente. Para CYP4V2, todas las muestras de control que no eran de pacientes expresaron niveles similares de CYP4V2, varios cientos de veces mayores que el nivel de expresión de CYP4V2 en la muestra de paciente. Después del tratamiento con AAV.CYP4V2, el nivel de expresión

de CYP4V2 de la muestra de paciente aumentó más de cien veces hasta un nivel comparable al de las muestras de control que no eran de pacientes (Figura 3). Para CYP4V2op, todas las muestras tratadas con AAV expresaron niveles mucho más altos en comparación con las muestras no tratadas (Figura 4). Estos resultados demostraron que los vectores de AAV pudieron suministrar el ADNc de CYP4V2 en células iPS-RPE de pacientes con BCD y los casetes de expresión fueron capaces de expresar el gen.

Ejemplo 4 - Fenotipo en el modelo celular de BCD y hallazgos sobre las funciones de CYP4V2

Resultados de los ensayos de lípidos:

Para determinar si existen defectos/anomalías bioquímicos (es decir, fenotipo) en el modelo celular de BCD (por ejemplo, células iPS-RPE de pacientes con BCD), se usaron los ensayos bioquímicos descritos en el Ejemplo 3 para detectar y cuantificar ácidos grasos, ceramidas, esfingomielinas, esfingosina, esfinganina y ácidos hidroxigrasos en las células iPS-RPE derivadas de pacientes con BCD en comparación con los de las células iPS-RPE derivadas de controles sanos.

Antes de los ensayos, las células se recogieron de la siguiente manera. Aproximadamente 1 millón de células iPS-RPE derivadas de un paciente con BCD se lavaron dos veces con PBS, después se separaron del plato mediante un elevador de células de plástico y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1,5 ml usando una pipeta de 1 ml. El tubo Eppendorf se colocó en un congelador a -80 °C antes de los ensayos. Se recogieron células iPS-RPE de control sanas de la misma manera. Los resultados de los ensayos bioquímicos se muestran en la Tabla 3 a continuación:

% molar de ácidos grasos totales	TS	P1	Tabla 3 Resultados del ensayo de ácidos grasos			P2 AAV2.op	P2 AAV8.fv	P2 scAAV1.op
			P1 AAV2.op	P2	P2 AAV2tri.op			
C12	0,2 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,0 %	0,0 %	0,1 %
C13	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
C14:1 Isómero 1	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,1 %	0,1 %
C14:1 Isómero 2	0,0 %	0,1 %	0,0 %	0,1 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,1 %
C14 Ácido mirístico	1,0 %	0,6 %	0,6 %	0,7 %	0,8 %	0,8 %	0,8 %	1,1 %
C15	1,3 %	0,5 %	0,7 %	0,5 %	0,5 %	0,6 %	0,6 %	0,7 %
C16:1 n7 cis	2,7 %	2,4 %	1,7 %	2,3 %	2,9 %	2,9 %	2,8 %	3,8 %
C16:1 n9 cis	0,9 %	0,9 %	0,8 %	1,0 %	1,0 %	1,1 %	1,2 %	1,6 %
C16:1 n7 trans	0,4 %	0,5 %	0,4 %	0,5 %	0,5 %	0,4 %	0,5 %	0,4 %
C16 Ácido palmítico	20,3 %	14,2 %	12,7 %	14,8 %	17,0 %	17,2 %	17,9 %	17,4 %
C17	1,1 %	0,5 %	0,8 %	0,5 %	0,4 %	0,5 %	0,5 %	0,4 %
C18:3 n3 Alfa	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
C18:3n6 Gama	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
C18:2 n6 9,12 cis	1,6 %	1,1 %	0,9 %	0,9 %	0,9 %	1,0 %	1,0 %	1,3 %
C18:2 n6 9,12 trans	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,0 %	0,1 %	0,1 %
C18:1 n9 Ácido oleico	22,2 %	20,9 %	19,0 %	18,5 %	19,4 %	20,8 %	19,7 %	28,6 %
C18 Ácido esteárico	26,3 %	17,9 %	24,2 %	19,4 %	16,5 %	16,6 %	17,7 %	14,4 %
C19	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %
C20:5 n3 EPA	0,8 %	1,9 %	1,3 %	1,9 %	1,6 %	1,7 %	1,4 %	1,6 %
C20:4 n6 AA	5,4 %	15,2 %	13,3 %	14,7 %	14,2 %	13,2 %	13,0 %	7,9 %
C20:4 Isómero	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
C20:3 n6	0,6 %	0,8 %	0,8 %	0,9 %	0,8 %	0,9 %	0,8 %	0,6 %

			Tabla 3 Resultados del ensayo de ácidos grasos					
C20:3 Isómero 1	0,1 %	0,3 %	0,3 %	0,4 %	0,3 %	0,3 %	0,3 %	0,1 %
C20:3 Isómero 2	3,8 %	6,0 %	5,5 %	5,1 %	5,5 %	4,1 %	4,2 %	3,0 %
C20:2 n6	0,4 %	0,4 %	0,5 %	0,3 %	0,4 %	0,3 %	0,4 %	0,6 %
C20:2 Isómero	0,6 %	0,6 %	0,8 %	0,7 %	0,8 %	0,7 %	0,7 %	0,9 %
C20:1 n9	3,7 %	2,9 %	2,7 %	2,7 %	3,6 %	3,4 %	3,3 %	6,1 %

(continuación)

Tabla 3 Resultados del ensayo de ácidos grasos								
C20 Ácido araquidónico	0,8 %	0,5 %	0,5 %	0,5 %	0,6 %	0,6 %	0,5 %	0,5 %
C21	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
C22:6 n3 DHA	2,2 %	6,1 %	5,6 %	7,2 %	6,2 %	6,5 %	6,5 %	4,1 %
C22:5 n3 DPA	1,0 %	2,0 %	2,4 %	2,8 %	2,1 %	2,6 %	2,1 %	1,7 %
C22:5 n6	0,1 %	0,4 %	0,5 %	0,4 %	0,3 %	0,3 %	0,4 %	0,2 %
C22:4 n6	0,7 %	1,3 %	1,7 %	1,4 %	1,4 %	1,3 %	1,3 %	1,0 %
C22:1 n9	0,5 %	0,6 %	0,6 %	0,6 %	0,7 %	0,7 %	0,7 %	0,9 %
C22	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,1 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,1 %
C23	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
C24:1 n9	0,3 %	0,4 %	0,4 %	0,4 %	0,4 %	0,4 %	0,5 %	0,3 %
C24	0,1 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,2 %	0,1 %
C26	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
C26:1	0,0 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,0 %
C26	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %	0,0 %
Suma	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %	100,0 %
Total de ácidos grasos n-3	4,0 %	10,0 %	9,4 %	11,9 %	9,9 %	10,8 %	10,1 %	7,4 %

Nota al pie de la Tabla 3:

TS: iPS-RPE de control de tipo silvestre. P1: iPS-RPE del Paciente 1. P2: iPS-RPE del Paciente 2.

Las muestras de pacientes no tratados y tratados con AAV se emparejaron en cuanto al día del cultivo y la estirpe clonada.

Las muestras de AAV2.op de P1 y de AAV2.op de P2 se trataron con AAV2.CYP4V2op (1 día. MOI: 5×10^4 GC/célula) y se cosecharon 10 días después del tratamiento. La muestra de AAV2trip.op de P2 se trató con AAV2tri(Y-F). CYP4V2op (1 día. MOI: 5×10^4 GC/célula) y se cosecharon 10 días después del tratamiento. La muestra de AAV8.fv de P2 se trató con AAV8.CYP4V2fv (1 día. MOI: 2×10^5 GC/célula) y se cosecharon 10 días después del tratamiento. La muestra de scAAV1.op de P2 se trató con scAAV1.CYP4V2op (1 día. MOI: 2×10^5 GC/célula) y se cosecharon 4 días después del tratamiento.

Los resultados mostraron que las muestras de células iPS-RPE de pacientes con BCD tienen un perfil de ácidos grasos diferente que el del control. En particular, las muestras de pacientes con BCD tienen niveles mucho más altos de DHA (C22:6 n3) y de ácidos grasos totales omega-3 (ω -3 o n3) (suma de C18:3 n3 Alfa, C20:5 n3 EPA, C22:6 n3 DHA y C22:5 n3 DPA) que los del control. Esto confirmó las sugerencias de un estudio anterior de que CYP4V2 afecta el metabolismo de los ácidos grasos omega-3.

Sorprendentemente, además de anomalías en los niveles de ácidos grasos n3, las células iPS-RPE de pacientes con BCD también mostraron un nivel más alto de C20:4 n6 (Ácido araquidónico o AA). No se han informado niveles anormales de AA en estudios anteriores relacionados con BCD.

Curiosamente, no se encontraron anomalías en los ácidos grasos n3 (incluyendo DHA) y n6 (incluyendo AA) en una investigación anterior que sometió a ensayo los niveles de ácidos grasos en el suero de pacientes con BCD. Los diferentes perfiles de ácidos grasos de las células iPS-RPE y el suero de pacientes con BCD respaldan la hipótesis de que la función de CYP4V2 es sustituida por otras enzimas CYP4 en células no retinianas o no RPE, muchas de las cuales se expresan en otros órganos y tejidos junto con CYP4V2, excepto por que CYP4V2 es la única enzima CYP4 con un nivel de expresión relativamente alto en las células RPE.

Además de los ácidos grasos, las células iPS-RPE de pacientes con BCD pueden tener fenotipo en otros compuestos o clases de compuestos. Se realizan experimentos para cribar fenotipos en otras clases de compuestos, incluyendo, sin limitación, corticoesteroide, esfingolípidos y fosfolípidos, incluyendo esfingomielina, ceramida, esfingosina y esfingonina, y en señalización de lípidos. Además, el experimento de rastreo isotópico y el análisis proteómico (por ejemplo, análisis proteómico basado en espectrometría de masas) se realizan en células iPS-RPE de pacientes con BCD.

Además, una investigación anterior encontró que CYP4V2 es una hidroxilasa de ácido graso ω -3 (DHA y EPA). Curiosamente, no se detectaron hidroxí-DHA o hidroxí-EPA descritos en el Ejemplo 3 ni en el control sano ni en las células iPS-RPE de pacientes con BCD usando CL-EM/EM. Es posible que las funciones enzimáticas de CYP4V2 sean diferentes en células vivas que en una reacción química fuera de células vivas que se realizó en la investigación anterior, o que los ácidos hidroxigrasos sean intermedios que se convierten rápidamente en otros compuestos o formas en células vivas, o los ácidos hidroxigrasos están en un nivel traza que solo puede detectarse

cuando una muestra contiene una cantidad muy grande de células.

Resultados del ensayo de viabilidad celular:

Clínicamente, BCD se asocia a atrofia del RPE, lo que a su vez provoca la muerte de los fotorreceptores y la pérdida de la visión. El ensayo de viabilidad celular (como se describe en el Ejemplo 3 anterior) reveló atrofia del RPE en muestras de células iPS-RPE de pacientes con BCD. Véase las Figuras 5 y 6 para comparar la viabilidad celular entre muestras de iPS-RPE de controles y pacientes con BCD (Figura 5 - sin exposición a luz azul; Figura 6 - después de 1 hora de exposición a luz azul).

De manera significativa, estas imágenes revelaron que:

(1) Después de la exposición a la luz, se mostraron niveles significativos de muerte celular en muestras de iPS-RPE derivadas de pacientes con BCD (P1 y P2), mucho más altos que los de los controles (TS1 y TS2) (Véase la Figura 6). Por ejemplo, la relación de células vivas/muertas de iPS-RPE de P1 fue del 20,87 %, en comparación con el 3,0 % para iPS-RPE de TS2. El fenotipo clínico de BCD, atrofia del RPE, fue evidente en el modelo celular de BCD.

(2) Se observaron diferentes niveles de atrofia del RPE entre las muestras de iPS-RPE de P1 y P2 de BCD. iPS-RPE de P1 mostraron un nivel de muerte celular más alto que iPS-RPE de P2.

(3) Incluso sin exposición a luz azul, la muestra de iPS-RPE del paciente con BCD (P1) mostró atrofia del RPE (Figura 5).

Los pacientes con BCD difieren ampliamente en la edad de inicio y progresión de la enfermedad. El inicio de la BCD varía desde principios de la adolescencia hasta los 3.^a década de vida o incluso más allá de la 3.^a década; conduciendo a la ceguera legal durante la 3.^a década a la 6.^a década de vida. Asimismo, los pacientes hermanos con BCD con la misma mutación de CYP4V2 pueden tener diferencias materiales en la edad de inicio y la progresión de la enfermedad. Anteriormente no había explicación para estas diferencias. La diferencia en los niveles de atrofia del RPE entre muestras de iPS-RPE de pacientes con BCD diferentes proporciona una directriz a nivel celular en cuanto a la diferencia en el inicio y la progresión de la enfermedad entre pacientes con BCD.

Se han encontrado múltiples fenotipos (tanto fenotipo a nivel molecular tal como anomalías bioquímicas (por ejemplo, lípidos) como fenotipo a nivel celular tal como viabilidad celular) en el modelo celular de BCD en este estudio, incluyendo el fenotipo clínico de BCD (es decir, atrofia del RPE).

Ejemplo 5 - Uso de células iPS e iPS-RPE de un sujeto con BCD para cribar fármacos candidatos y el intervalo de dosificación, estudiar BCD y la función de CYP4V2 en terapia celular, y para evaluar las respuestas específicas de los pacientes

Como modelo celular humano de la enfermedad BCD, las células iPS e iPS-RPE de pacientes con BCD tienen una amplia gama de aplicaciones, incluyendo, sin limitación, para estudiar BCD y la función de CYP4V2 (véanse los Ejemplos 3 y 4 anteriores, por ejemplo); para cribar fármacos candidatos y el intervalo de dosificación para la BCD y enfermedades relacionadas (véase los Ejemplos del presente documento).

En los Ejemplos del presente documento se describen en detalle métodos y ejemplos para usar el modelo celular de BCD (por ejemplo, estirpe celular iPS-RPE específica de pacientes con BCD o estirpes celulares de iPS-RPE con mutaciones de CYP4V2 generadas artificialmente), que se relacionan con el uso del modelo celular de BCD en terapia génica y terapia celular. Además de someter a ensayo la terapia génica y como base celular para la terapia celular, dicho modelo celular de BCD puede usarse para cribar y someter a ensayo la eficacia y/o seguridad de otros agentes terapéuticos (por ejemplo, fármacos candidatos) y la dosificación, formulación y vector (vectores víricos o no víricos) de los mismos o dispositivos o mecanismos de suministro para tratar BCD, IRD o RP, de la misma manera o similar a la descrita en detalle en los Ejemplos del presente documento.

Al usar el modelo celular de BCD, la eficacia de un agente terapéutico puede evaluarse comparando los niveles de compuestos en las diversas especies y la atrofia del RPE descrita en los Ejemplos 3 y 4 anteriores y otros Ejemplos del presente documento antes del tratamiento y después del tratamiento con dicho agente terapéutico y evaluar si las anomalías en los niveles de estos compuestos y si la atrofia del RPE en el modelo celular de BCD mejoran después del tratamiento. De forma similar, usando el Modelo celular de BCD pueden compararse diferentes dosis, formulaciones (por ejemplo, formulación para compuestos químicos, principios activos farmacéuticos o tipo de vector y/o cápside para terapia génica, o tipo de vector para edición génica) o construcciones clave (por ejemplo, un promotor u otra secuencia reguladora en un casete de expresión de terapia génica) de un agente terapéutico. Asimismo, el modelo celular de BCD puede usarse para someter a ensayo la eficacia de un dispositivo o método médico, incluyendo, sin limitación, en el suministro de agentes terapéuticos a las células oculares o en la mejora de la eficiencia de transducción o transfección. Se entenderá que las células tratadas se pueden comparar con células no tratadas o con las mismas células antes de la exposición al compuesto. Pueden usarse diferentes dosificaciones para determinar el intervalo de dosificación eficaz (medido por célula, por 1 millón de células o por 0,5 millones de células, etc.). Para evaluar el efecto terapéutico y el intervalo de dosificación eficaz pueden usarse datos relacionados con los niveles de diferentes compuestos de ácidos

grasos y otros compuestos y la atrofia del RPE indicados en los Ejemplos 3 y 4 anteriores, en células iPS-RPE de pacientes con BCD (después del tratamiento frente a sin tratamiento) en comparación con los de células RPE o iPS-RPE de control sano.

Además, pueden usarse estirpes celulares de iPS específicas de paciente con BCD, estirpes celulares de iPS-RPE y otras estirpes celulares derivadas de iPS para evaluar las respuestas individuales de dicho paciente a un agente terapéutico, dosis o dispositivo. Las células iPS, células iPS-RPE y otras células derivadas de iPS específicas de paciente poseen rasgos específicos de cada paciente, incluyendo, sin limitación, la respuesta inmunitaria (por ejemplo, inmunidad intracelular, inmunidad del RPE), el genotipo (por ejemplo, diferentes mutaciones entre pacientes que pueden dar como resultado una respuesta diferente). Dicha aplicación puede usarse para desarrollar y cribar agentes terapéuticos individualizados (por ejemplo, diferentes serotipos de vectores de AAV o mutaciones de la cápside) o una dosificación óptima personalizada para diferentes pacientes con la misma enfermedad. Este enfoque puede usarse para otras enfermedades, incluyendo, sin limitación, otras enfermedades oculares.

Puesto que la iPS-RPE específica de paciente con BCD reveló diferencias individuales en los pacientes con BCD, puede usarse para evaluar la dosificación óptima individualizada y desarrollar un medicamento personalizado. Por ejemplo, como se observa en los Ejemplos de terapia génica a continuación, con la misma dosificación de 1×10^6 MOI, AAV2.CYP4V2op logró diferentes niveles de rescate (es decir, diferentes niveles de eficacia) de la atrofia del RPE entre las iPS-RPE de P1 y P2. Esta es una ventaja que tiene el modelo celular de BCD sobre los modelos animales.

Las células iPS-RPE específicas de paciente con BCD (es decir, modelo celular de BCD) pueden usarse para evaluar y sugerir dosis terapéuticas eficaces para el tratamiento *in vivo* multiplicando el nivel de dosis óptimo (por ejemplo, indicado como MOI para la terapia génica *in vitro*) determinado en el modelo celular de BCD *in vitro* por el número estimado de células oculares (por ejemplo, células RPE) diana del tratamiento *in vivo* para llegar al nivel de dosis de los vectores de terapia génica para su uso *in vivo* (por ejemplo, GC o gp). Dicho nivel de dosis de vector se ajusta mediante un multiplicador (por ejemplo, de 1 a 10 (por ejemplo, de 1 a 5 para inyección subretiniana o de 5 a 10 para inyección intravítrea; los otros factores que afectan al multiplicador que se aplicará incluyen el tamaño del área diana y el sujeto que se está tratando (por ejemplo, la edad, el peso, la fase de desarrollo de la enfermedad y el estado del sujeto que se ha de tratar, y posibles reacciones inmunitarias (es decir, NAb preexistentes); la ubicación y la densidad de las células diana del tratamiento) para sugerir el intervalo de dosis terapéuticamente eficaz para el tratamiento *in vivo*, que puede confirmarse o perfeccionarse mediante ensayos clínicos. Este método también puede usarse para evaluar o sugerir una dosis óptima personalizada para el tratamiento *in vivo* para pacientes individuales.

Ejemplo 6 - Modelo celular de BCD con mutaciones de CYP4V2 creadas artificialmente

Debido a que la BCD es una enfermedad rara, puede ser difícil obtener muestras de pacientes. Para superar esta dificultad, puede generarse un modelo celular de BCD mediante el uso de tecnologías de edición génica tales como CRISPR para crear mutaciones artificiales en el gen CYP4V2 en células de pacientes sin BCD, tales como estirpes de células madre embrionarias (ES) o células iPS de un sujeto sin BCD.

Por ejemplo, como se demuestra en los Ejemplos del presente documento, se usaron ARN_gu 1, ARN_gu 2, ARN_gu 3, ARN_gu 4 o ARN_gu 5 (Véanse las SEQ ID NO: 48 a 52 para consultar la secuencia de elementos protoespaciadores en cada uno de sg\$NAI, ARN_gu2, ARN_gu3, ARN_gu4 y ARN_gu5, respectivamente; Véase las SEQ ID NO: 55 y 59 para consultar secuencias adicionales de los ARN_gu de IVT) en combinación con la proteína SpCas9 para crear escisión en una región del gen CYP4V2 en el ADN genómico de un paciente con BCD que contenía la mutación c.802-8_810del17insGC, la mutación de CYP4V2 más común entre los pacientes con BCD. Entre ellos, ARN_gu 3, ARN_gu 4 y ARN_gu 5 no son específicos de la secuencia de la mutación c.802-8_810del17insGC y, por lo tanto, pueden crear una rotura bicatenaria del ADN (DSB) en el gen CYP4V2 de una célula sana (por ejemplo, una ES o iPSC sin una mutación de CYP4V2). En particular, después de la transfección, ARN_gu 4 y Cas9 pueden crear una DSB en el exón 7 del gen CYP4V2, que puede dar como resultado una mutación en el exón 7 (en uno o ambos alelos) cuando el ADN se repara mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) en las células, por ejemplo, un error de indel creado por NHEJ puede dar como resultado una mutación por desplazamiento de marco de lectura. Como resultado, algunas células pueden tener mutaciones de CYP4V2 creadas artificialmente y pueden usarse como modelo de enfermedad celular de BCD o usarse para generar un modelo celular de BCD (por ejemplo, diferenciar las células ES o iPS en células RPE para generar la mutación de CYP4V2 que contiene células ES-RPE o iPS-RPE). De forma similar, pueden usarse dos conjuntos de ARN_g diseñados para crear DSB en diferentes regiones del gen CYP4V2 para generar una delección grande o una mutación de inactivación dentro del gen CYP4V2 o para inactivar todo el gen CYP4V2 en las células, generando de este modo un modelo celular de BCD que contiene una o más mutaciones de CYP4V2. En los Ejemplos y la divulgación del presente documento se proporciona un análisis más detallado sobre cómo usar el sistema CRISPR para cortar y/o corregir una secuencia diana, y cómo validar los resultados.

Estos modelos celulares de BCD con mutaciones de CYP4V2 creadas artificialmente pueden usarse para imitar el

modelo celular de BCD específico de paciente en el estudio de las funciones de BCD y CYP4V2, así como en aplicaciones relacionadas como se analiza en el presente documento, incluyendo, pero sin limitación, someter a ensayo y comparar fármacos candidatos, determinar el intervalo de dosificación y someter a ensayo el dispositivo médico o el método de suministro.

El mismo método puede usarse para generar modelos de enfermedades celulares con mutaciones creadas artificialmente para una enfermedad ocular u otra enfermedad, incluyendo las asociadas a una mutación o defecto genético en uno o más genes expuestos en la Tabla 4.

Ejemplo 7 - Generación y uso de control isogénico para enfermedades oculares

Una estirpe celular iPS isogénica corregida por mutación específica de paciente y/u otras estirpes celulares derivadas de la misma (por ejemplo, células iPS-RPE, iPS-RPC, iPS-CEC, células iPS-CE u otras células iPS-oculares) pueden usarse como control isogénico en el estudio de una enfermedad y/o las implicaciones de la mutación específica o gen defectuoso. Un control convencional (por ejemplo, una estirpe celular, por ejemplo, una estirpe celular de ES-RPR o iPS-RPE) derivada de ES u otro individuo posee diferencias individuales que incluyen diferencias genéticas de un paciente además de diferencias en el gen relacionado con la enfermedad. Este Ejemplo proporciona un método para eliminar diferencias individuales entre controles y el "ruido de fondo" resultante de los mismos. Comprende generar y usar un control isogénico corregido por mutación de un paciente para compararlo con la estirpe celular del mismo paciente que alberga la mutación. Puesto que un modelo de enfermedad específico de paciente y un control isogénico corregido por mutación derivado del mismo paciente no tienen diferencias individuales, se pueden analizar y comparar para identificar con precisión el fenotipo, anomalías bioquímicas y otros defectos estructurales y funcionales asociados a la mutación o gen defectuoso del paciente. Se puede generar un control isogénico corregido por mutación mediante el uso de tecnologías de edición génica que incluyen, sin limitación, CRISPR, ZFN y TALEN. En los ejemplos del presente documento se proporciona un ejemplo específico sobre cómo usar la edición génica por CRISPR para corregir la mutación c.802-8_810del17insGC, la mutación más común entre los pacientes con BCD, generando de este modo un control isogénico a partir de un paciente con BCD. Puede usarse el mismo enfoque para crear un control isogénico de otras enfermedades oculares. Los controles isogénicos tienen ventajas significativas sobre los controles convencionales y pueden ser indispensables en el estudio de enfermedades oculares con un fenotipo sutil (por ejemplo, la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE). Asimismo, los controles isogénicos pueden usarse para comparar e identificar las diferencias de impacto de múltiples factores de riesgo genéticos, mutaciones y/o múltiples genes en una enfermedad ocular creando un control isogénico con cada uno de entre los factores de riesgo genéticos, la mutación o el gen corregido y comparar dicho control isogénico con el modelo de enfermedad para determinar el impacto del factor de riesgo, mutación o gen relacionados en la enfermedad ocular y otras enfermedades, incluidos las asociadas a la mutación o defecto genético en uno o más genes expuestos en la Tabla 4.

Un control isogénico se puede comparar con un modelo de enfermedad celular específico de paciente para identificar el fenotipo, anomalías bioquímicas y otros defectos estructurales y funcionales asociados a la mutación genética y/o la proteína defectuosa relacionada. En el presente documento se proporcionan un ejemplo no limitante específico y análisis sobre cómo usar bioensayos para identificar anomalías bioquímicas/fenotipo entre estirpes celulares de pacientes y controles en los Ejemplos 3 y 4 anteriores, incluyendo, sin limitación, lipidómica, proteómica y rastreo isotópico.

Análisis sobre el modelo de enfermedad celular humana de BCD

Dado que la BCD es una enfermedad rara, no es práctico obtener las células RPE humanas que manifiestan la enfermedad de pacientes con BCD mediante biopsia. La falta de un modelo viable de enfermedad humana de BCD ha limitado la investigación previa sobre la BCD al uso de células que no provocan la enfermedad BCD (por ejemplo, fibroblastos y linfocitos, que no forman parte del ojo) y suero de pacientes con BCD como sujetos de estudio. Los resultados de estos estudios se centraron en el anabolismo de los ácidos grasos.

En el estudio descritos en el presente documento, se generaron y usaron con éxito estirpes celulares de iPS derivadas de pacientes con BCD para generar células RPE con enfermedad BCD específicas de paciente, que portan el fenotipo de la enfermedad BCD *in vitro*. El fenotipo de BCD se identificó directamente en células iPS-RPE específicas de paciente con BCD, el principal tipo celular afectado en la BCD. Antes del presente estudio, no se sabía si las estirpes celulares de iPS y las estirpes celulares de iPS-RPE podrían generarse con éxito debido, en parte, al anabolismo de los ácidos grasos asociado a la BCD.

Los ensayos bioquímicos mostraron que las células iPS-RPE de pacientes con BCD tienen niveles anormales de ácidos grasos en comparación con los de las células iPS-RPE de controles sanos, incluyendo aquellos que no han sido reportados en estudios de BCD anteriores. El fenotipo *in vitro* de las células iPS-RPE específicas de la enfermedad BCD proporciona más información sobre las vías reguladas por CYP4V2 y la patogenia de BCD, y proporcionó información invaluable sobre la patogenia de BCD y la función de la proteína CYP4V2, y respalda aún más el uso de estirpes celulares de iPS-RPE de pacientes con BCD como un modelo de enfermedad humana de BCD viable y robusto.

Las estirpes celulares de iPS, las estirpes celulares de iPS-RPE y otras estirpes celulares iPS-oculares de pacientes con BCD tienen otras aplicaciones, tales como el uso para cribar fármacos, desarrollar agentes terapéuticos novedosos o determinar intervalos de dosificación, así como su uso en terapia celular.

Además de iPS, iPS-RPE y otras estirpes celulares iPS-oculares específicas de paciente con BCD, se puede desarrollar un modelo celular de enfermedad humana de BCD mediante edición génica para crear mutaciones patológicas de CYP4V2 artificialmente en otras estirpes celulares derivadas de células ES o células iPS de individuos sin BCD, incluyendo, sin limitación, estirpes celulares de ES, estirpes celulares de iPS y estirpes celulares de RPE.

Además, se proporcionan métodos para generar controles isogénicos para enfermedades oculares. Los controles isogénicos no poseen diferencias individuales con respecto a un modelo de enfermedad específico de paciente. Por lo tanto, un control isogénico tiene sus ventajas en el estudio de enfermedades oculares sobre los controles convencionales.

Terapia génica con CYP4V2

Ejemplo 8: ADNc que codifica la proteína CYP4V2 humana y una proteína CYP4V2 funcional

En el estudio se usaron tres ADNc. El ADNc con la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 (denominado en el presente documento CYP4V2st) y el ADNc con la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 2 (denominado en el presente documento CYP4V2op) codifican ambos la proteína CYP4V2 humana (secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. NP_997235.3). El ADNc con la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 3 (denominado en el presente documento CYP4V2fv) codifica una variante funcional de la proteína CYP4V2 humana (secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5).

La SEQ ID NO: 5 es la secuencia de aminoácidos de una variante funcional de la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4). Ambas proteínas (SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5) son proteínas CYP4V2 funcionales como se definen en el presente documento. La proteína CYP4V2 funcional que se muestra en la SEQ ID NO: 5 tiene un cambio de aminoácido con respecto a la proteína CYP4V2 humana que se muestra en la SEQ ID NO: 4. El ADNc mostrado en la SEQ ID NO: 3 que codifica la proteína CYP4V2 funcional (SEQ ID NO: 5) tiene dos diferencias de nucleótidos con respecto al ADNc mostrado en la SEQ ID NO: 1 que codifica la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4). Tanto el ADNc con codones optimizados que se muestra en la SEQ ID NO: 2 como el ADNc que se muestra en la SEQ ID NO: 1 codifican la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4) y comparten una identidad de secuencia del 77 %.

En el presente documento se proporciona un ADNc con codones optimizados (CYP4V2fv-op) que codifica la proteína CYP4V2 funcional de la SEQ ID NO: 5 que comprende la secuencia de ADNc de CYP4V2op (SEQ ID NO: 2), excepto por que la secuencia de CYP4V2 fv-op conserva la una o dos diferencias de nucleótidos entre las SEQ ID NO: 1 y 3.

Además de CYP4V2op y CYP4V2fv-op, otros ADNc con codones optimizados o secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína CYP4V2 humana o una proteína CYP4V2 funcional (por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NO: 4 a 29) se pueden generar mediante métodos descritos en la divulgación del presente documento. Una molécula de ácido nucleico con codones optimizados que codifica la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4) o una proteína CYP4V2 funcional (SEQ ID NO: 5 o cualquiera de las SEQ ID NO: 6 a 29) se pueden someter a ensayo en estirpes celulares de iPS-RPE específicas de paciente con BCD (o células RPE con mutaciones de CYP4V2 creadas artificialmente) para determinar y/o confirmar su eficiencia de expresión y función de rescate para el tratamiento de BCD. Dichos ensayos incluyen, sin limitación, expresión de proteínas (por ejemplo, transferencia Western específica de la proteína CYP4V2 funcional que codifica), PCR para detectar la expresión génica relacionada y/o eficacia para rescatar las anomalías bioquímicas y la atrofia del RPE en estirpes celulares de iPS-RPE específicas de paciente con BCD mediante composiciones (por ejemplo, en un casete de expresión y/o un vector) y métodos proporcionados en el presente documento.

SEQ ID NO: 1 (ADNc de CYP4V2st, 1578 pb)

```
ATGGCGGGGCTCTGGCTGGGGCTCGTGTGGCAGAAGCTGCTGCTGTGGGGCGCGGCGAGTGCCC
TTTCCCTGGCGGGCGCCAGTCTGGTCCTGAGCCTGCTGCAGAGGGTGGCGAGCTACGCGCGGAA
ATGGCAGCAGATGCGGCCCATCCCCACGGTGGCCCGCGCTACCCACTGGTGGGCCACGCGCTG
CTGATGAAGCCGGACGGGCGAGAATTTTTTCAGCAGATCATTGAGTACACAGAGGAATACCGCC
ACATGCCGCTGCTGAAGCTCTGGGTGGGCCAGTGCCCATGGTGGCCCTTTATAATGCAGAAAA
```

TGTGGAGGTAATTTTAACTAGTTCAAAGCAAATTGACAAATCCTCTATGTACAAGTTTTTAGAA
CCATGGCTTGGCCTAGGACTTCTTACAAGTACTGGAAACAAATGGCGCTCCAGGAGAAAGATGT
TAACACCCACTTTCCATTTTACCATTCTGGAAGATTTCTTAGATATCATGAATGAACAAGCAAA
TATATTGGTTAAGAACTTGAAAAACACATTAACCAAGAAGCATTCTTAACTGCTTTTTTTTACATC
ACTCTTTGTGCCTTAGATATCATCTGTGAAACAGCTATGGGGAAGAATATTGGTGCTCAAAGTA
ATGATGATTCCGAGTATGTCCGTGCAGTTTATAGAATGAGTGAGATGATATTTTGAAGAATAAA
GATGCCCTGGCTTTGGCTTGATCTCTGGTACCTTATGTTTAAAGAAGGATGGGAACACAAAAAG
AGCCTTCAGATCCTACATACTTTTACCAACAGTGTCTATCGCTGAACGGGCCAATGAAATGAACG
CCAATGAAGACTGTAGAGGTGATGGCAGGGGCTCTGCCCCCTCCAAAAATAAACGCAGGGCCTT
TCTTGACTTGCTTTTAAAGTGTGACTGATGACGAAGGGAACAGGCTAAGTCATGAAGATATTGGA
GAAGAAGTTGACACCTTCATGTTTGAGGGGCACGATACAACCTGCAGCTGCAATAAACTGGTCTT
TATACCTGTTGGGTTCTAACCAGAAAGTCCAGAAAAAGTGGATCATGAATTGGATGACGTGTT
TGGGAAGTCTGACCGTCCCGCTACAGTAGAAGACCTGAAGAACTTCGGTATCTGGAATGTGTT
ATTAAGGAGACCTTCGCCTTTTTCCCTTCTGTTTCTTTATTTGCCCCGTAGTGTAGTGAAGATT
GTGAAGTGGCAGGTTACAGAGTTCTAAAAGGCACTGAAGCCGTCTATTCCTATGCATTGCA
CAGAGATCCGAGATACTTCCCCAACCCCGAGGAGTTCCAGCCTGAGCGGTTCTTCCCCGAGAAT
GCACAAGGGCGCCATCCATATGCCTACGTGCCCTTCTCTGCTGGCCCCAGGAAGTGTATAGGTC
AAAAGTTTGCTGTGATGGAAGAAAAGACCATTTCTTCGTGCATCCTGAGGCACTTTTGGATAGA
ATCCAACCAGAAAAGAGAAGAGCTTGGTCTAGAAGGACAGTTGATTCTTCGTCCAAGTAATGGC
ATCTGGATCAAGTTGAAGAGGAGAAATGCAGATGAACGCTAA

SEQ ID NO: 2 (ADNc de CYP4V2op, 1578 pb)

ATGGCTGGACTGTGGCTGGGACTGGTGTGGCAGAACTGCTGCTGTGGGGGGCCGCTTCCGCAC
TGTCACTGGCTGGGGCTTCACCTGGTGCTGAGCCTGCTGCAGAGGGTGGCCTCCTACGCCAGAAA
GTGGCAGCAGATGAGGCCCATCCCTACCGTGGCCAGAGCCTATCCACTGGTGGGACACGCACTG
CTGATGAAGCCTGACGGCAGAGAGTTCTTTACGAGATCATCGAGTACACAGAGGAGTATAGGC
ACATGCCACTGCTGAAGCTGTGGGTGGGACCCGTGCCTATGGTGGCCCTGTACAACGCCGAGAA
TGTGGAAGTGATCCTGACCAGCAGCAAGCAGATCGATAAGTCTAGCATGTATAAGTTCTCTGGAG
CCTTGGCTGGGCTGGGCTGGCTGACCTCTACAGGCAACAAGTGGAGGAGCCGGAGAAAGATGC
TGACCCCAACATTCCACTTTACAATCCTGGAGGACTTCTTGACATCATGAACGAGCAGGCCAA
TATCCTGGTGAAGAAGCTGGAGAAGCACATCAACCAGGAGGCCTTTAATTGCTTCTTTTACATC
ACCCTGTGCGCCCTGGACATCATCTGTGAGACAGCTATGGGCAAGAACATCGGCGCCAGTCTA
ATGACGATAGCGAGTACGTGCGGGCCGTGTATAGAATGAGCGAGATGATCTTTAGGCGCATCAA
GATGCCCTGGCTGTGGCTGGATCTGTGGTATCTGATGTTCAAGGAGGGCTGGGAGCACAGAAG
TCCCTGCAGATCCTGCACACCTTTACAACTCTGTGATCGCCGAGAGAGCCAATGAGATGAACG
CCAATGAGGACTGTAGGGGCGATGGAAGGGGCAGCGCCCTTCCAAGAACAAGCGGAGAGCCTT
CCTGGACCTGCTGCTGAGCGTGACCGACGATGAGGGCAATCGCCTGTCCACGAGGACATCCGG
GAGGAGGTGGATACATTGATGTTTGAGGGACACGACACCACAGCCGCCCATCAACTGGTCCC
TGTACCTGCTGGGCTCTAATCCAGAGGTGCAGAAGAAGGTGGATCACGAGCTGGACGACGTGTT
CGGCAAGTCCGACAGGCCAGCAACCGTGGAGGATCTGAAGAAGCTGAGATACCTGGAGTGCGTG
ATCAAGGAGACACTGCGCCTGTTCCCTCTGTGCCTCTGTTTGGCCGTCCGTGTCTGAGGACT
GTGAGGTGGCCGGCTATCGCGTGCTGAAGGGCACCGAGGCGGTGATCATCCCTTACGCCCTGCA
CCGGGACCCAGGTATTTCCCTAACCCAGAGGAGTTTACGCCAGAGAGATTCTTTCCCGAGAAT
GCCCAGGGCAGGCACCTTACGCCTATGTGCCATTCTCCGCCGACCAAGGAAGTGCATCGGAC
AGAAGTTTGCCGTGATGGAGGAGAAAACCATCCTGTCTTGTATCCTGAGACACTTCTGGATCGA
GAGCAATCAGAAGAGGGAGGAGCTGGGCCTGGAGGGACAGCTGATCCTGCGGCCAAGCAACGGC
ATCTGGATCAAACCTGAAAAGAAGGAACGCTGACGAGAGGTAA

5

SEQ ID NO: 3 (ADNc de CYP4V2fv, 1578 pb)

ATGGCGGGGCTCTGGCTGGGGCTCGTGTGGCAGAAGCTGCTGCTGTGGGGCGCGGCGAGTGCCC
 TTTCCCTGGCCGGCGCCAGTCTGGTCCTGAGCCTGCTGCAGAGGGTGGCGAGCTACGCGCGGAA
 ATGGCAGCAGATGCGGCCCATCCCCACGGTGGCCCGCGCTACCCACTGGTGGGCCACGCGCTG
 CTGATGAAGCCGGACGGGCGAGAATTTTTTTCAGCAGATCATTGAGTACACAGAGGAATACCGCC
 ACATGCCGCTGCTGAAGCTCTGGGTCTGGGCCAGTGCCCATGGTGGCCCTTTATAATGCAGAAAA
 TGTGGAGGTAATTTTAACTAGTTCAAAGCAAATTGACAAATCCTCTATGTACAAGTTTTTAGAA
 CCATGGCTTGGCCTAGGACTTCTTACAAGTACTGGAAACAAATGGCGCTCCAGGAGAAAGATGT
 TAACACCCACTTTCCATTTTACCATTCTGGAAGATTTCTTAGATATCATGAATGAACAAGCAAA
 TATATTGGTTAAGAACTTGAAAAACACATTAAACCAAGAAGCATTTAACTGCTTTTTTTTACATC
 ACTCTTTGTGCCTTAGATATCATCTGTGAAACAGCTATGGGGAAGAATATTGGTGTCTCAAAGTA
 ATGATGATTCCGAGTATGTCCGTGCAGTTTATAGAATGAGTGAGATGATATTTTGAAGAATAAA
 GATGCCCTGGCTTTGGCTTGATCTCTGGTACCTTATGTTTAAAGAAGGATGGGAACACAAAAAG
 AGCCTTAAGATCTACATACTTTTACCAACAGTGTATCGCGGAACGGGCCAATGAAATGAACG
 CCAATGAAGACTGTAGAGGTGATGGCAGGGGCTCTGCCCCCTCCAAAAATAAACGCAGGGCCTT
 TCTTGACTTGCTTTTAAAGTGTGACTGATGACGAAGGGAACAGGCTAAGTCATGAAGATATTCGA
 GAAGAAGTTGACACCTTCATGTTTGAGGGGCACGATACAACTGCAGCTGCAATAAACTGGTCTCT
 TATACCTGTTGGGTTCTAACCAGAAAGTCCAGAAAAAAGTGGATCATGAATTGGATGACGTGTT
 TGGGAAGTCTGACCGTCCCGCTACAGTAGAAGACCTGAAGAACTTCGGTATCTGGAATGTGTT
 ATTAAGGAGACCTTCGCCTTTTTCTTCTGTTTCTTTATTTGCCCCGTAGTGTTAGTGAAGATT
 GTGAAGTGGCAGGTACAGAGTTCTAAAAGGCACTGAAGCCGTCATCATTCCCTATGCATTGCA
 CAGAGATCCGAGATACTTCCCCAACCCGAGGAGTTCCAGCCTGAGCGGTTCTTCCCCGAGAAAT
 GCACAAGGGCGCCATCCATATGCCTACGTGCCCTTCTCTGCTGGCCCCAGGAACTGTATAGGTC
 AAAAGTTTGCTGTGATGGAAGAAAAGACCATTCTTTCTGTGCATCCTGAGGCACTTTTGGATAGA
 ATCCAACCAGAAAAGAGAAGAGCTTGGTCTAGAAGGACAGTTGATTCTTCGTCCAAGTAATGGC
 ATCTGGATCAAGTTGAAGAGGAGAAATGCAGATGAACGCTAA

SEQ ID NO: 4 (proteína CYP4V2 humana, NP_997235.3, 525 aa)

MAGLWLGLVWQKLLLWGAASALSLAGASLVLSLLQRVASYARKWQQMRPIPTVARAYPLVGHAL
 LMKPDGREFFQQII EYTEEYRHMPLLLKLVGVPVPMVALYNAENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLE
 PWLGLGLLTSTGNKWSRRKMLTPTFHFTILEDFLDIMNEQANILVKKLEKHINQEAFNCFYI
 TLCALDI ICETAMGKNIGAQSNDDEYVRAVYRMSEMI FRRIKMPWLWLDLWYLMFKEGWEHKK
 SLQILHTFTNSVIAERANEMNANEDCRGDGRGSAPSKNKRRAFLDLLSVTDDEGNRLSHEDIR
 EEVDTFMFEGHDTTAAAINWSLYLLGSNPEVQKKVDHELDDVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECV
 IKETLRLFPSVPLFARSVSEDCEVAGYRVLKGTEAVI IPYALHRDPYFPNPPEEFQPERFFPEN
 AQGRHPYAYVPFSAGPRNCIGQKFAVMEKTI LSCILRHFWIESNQKREELGLEGLILRPSNG
 IWIKLKRRNADER

5

SEQ ID NO: 5 (variante funcional de la proteína CYP4V2 humana; 525 aa)

MAGLWLGLVWQKLLLWGAASALSLAGASLVLSLLQRVASYARKWQQMRPIPTVARAYPLVGHAL
 LMKPDGREFFQQII EYTEEYRHMPLLLKLVGVPVPMVALYNAENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLE
 PWLGLGLLTSTGNKWSRRKMLTPTFHFTILEDFLDIMNEQANILVKKLEKHINQEAFNCFYI
 TLCALDI ICETAMGKNIGAQSNDDEYVRAVYRMSEMI FRRIKMPWLWLDLWYLMFKEGWEHKK
 SLKILHTFTNSVIAERANEMNANEDCRGDGRGSAPSKNKRRAFLDLLSVTDDEGNRLSHEDIR
 EEVDTFMFEGHDTTAAAINWSLYLLGSNPEVQKKVDHELDDVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECV
 IKETLRLFPSVPLFARSVSEDCEVAGYRVLKGTEAVI IPYALHRDPYFPNPPEEFQPERFFPEN
 AQGRHPYAYVPFSAGPRNCIGQKFAVMEKTI LSCILRHFWIESNQKREELGLEGLILRPSNG
 IWIKLKRRNADER

10

SEQ ID NO: 6 (fragmento de CYP4V2 sin dominio transmembrana; 490 aa)

RVASYARKWQQMRPIPTVARAYPLVGHALLMKPDGREFFQQII EYTEEYRHMPLLLKLVGVPVPM
 VALYNAENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLEPWLGLGLLTSTGNKWSRRKMLTPTFHFTILEDFL
 DIMNEQANILVKKLEKHINQEAFNCFYITLALDI ICETAMGKNIGAQSNDDEYVRAVYRMS
 EMIFRRIKMPWLWLDLWYLMFKEGWEHKKSLQILHTFTNSVIAERANEMNANEDCRGDGRGSAP
 SKNKRRAFLDLLSVTDDEGNRLSHEDIR EEVDTFMFEGHDTTAAAINWSLYLLGSNPEVQKKV
 DHELDDVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECVIKETLRLFPSVPLFARSVSEDCEVAGYRVLKGTEA
 VIIPYALHRDPYFPNPPEEFQPERFFPEN AQGRHPYAYVPFSAGPRNCIGQKFAVMEKTI LSC
 ILRHFWIESNQKREELGLEGLILRPSNGIWIKLKRRNADER

Ejemplo 9 - Diseño de casetes de expresión y vectores de suministro eficientes para la terapia génica con CYP4V2

Como se describe en el presente documento, un casete de expresión y un vector de suministro comprenden diversos elementos. Los resultados pueden variar significativamente según los diferentes diseños. Dada la gran cantidad de opciones en cada uno de los elementos importantes, incluyendo, pero sin limitación, los que se enumeran a continuación y numerosas combinaciones de los mismos, se requiere un diseño cuidadoso de casetes de expresión y vectores de suministro eficientes para el éxito de la terapia génica con CYP4V2. Asimismo, el proceso de diseño debe tener en cuenta el fenotipo y las características de la enfermedad (por ejemplo, tipos celulares/tejidos diana del tratamiento) y la seguridad (por ejemplo, toxicidad, respuesta inmunitaria). Por último, un diseño debe someterse a ensayo y verificarse en un modelo de enfermedad sólido.

- (a) Tipo de vector de suministro;
- (b) Diseño/selección del serotipo del vector y de la cápside;
- (c) Diseño adicional del vector, por ejemplo, ssAAV frente a scAAV;
- (d) Diseño de ADNc;
- (e) diseño/selección del promotor;
- (f) diseño/selección de señal de poliA; y
- (g) cualesquier otras secuencias reguladoras, por ejemplo, un potenciador o secuencia de unión/enlazador.

Para (a), se eligió un vector vírico para lograr una alta eficiencia de transducción en células diana (por ejemplo, RPE humana). Entre diversos tipos de vectores víricos, se eligieron vectores de AAV debido a su perfil de seguridad y al tamaño del ácido nucleico que codifica CYP4V2 (por ejemplo, un ADNc de CYP4V2) que se ajusta al límite de empaquetamiento de los vectores de AAV. También pueden usarse para la terapia génica con CYP4V2 vectores con mayor límite de empaquetamiento, por ejemplo, un vector de HSV, un vector lentivírico, vectores de baculovirus o adenovirus. Además de los vectores víricos, también puede usarse para la terapia génica con CYP4V2 vectores no víricos, por ejemplo, nanopartículas, incluyendo, pero sin limitación, nanopartículas de liposomas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipoplex de protamina de liposoma/ADN (LPD).

Para (b), debido a que las células RPE son el tipo celular principal diana del tratamiento en la terapia génica con CYP4V2 para la BCD, se prefiere un serotipo de AAV con suficiente eficiencia de transducción en células RPE. Asimismo, se consideraron los siguientes factores. Debido a que la expresión de CYP4V2 se observó ampliamente en diversos tejidos y órganos humanos, por ejemplo, corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, retina, RPE, córnea y linfocitos, y además del RPE, la BCD también afecta a la coroides, fotorreceptores y, en algunos pacientes, la córnea, y que previamente se han informado anomalías en los fibroblastos de la piel, los linfocitos y el suero de los pacientes con BCD, se puede diseñar y/o seleccionar serotipos de AAV y estructuras de la cápside que no restrinjan la transducción de AAV solo en células RPE, sino que también puedan transducir otras células/tejidos, por ejemplo, fotorreceptores, coroides y/o córnea, además de serotipos de AAV y estructuras de la cápside con buena eficiencia de transducción en células RPE. Como resultado, son adecuados y pueden usarse una amplia gama de serotipos de AAV y estructuras de la cápside. Se seleccionaron para el estudio AAV2, AAV5, AAV8, AAV1, AAV9 y un vector de AAV mutante de la cápside (AAV2 (Y444F+Y500F+Y730F)). Además de la eficiencia de transducción, otro factor que se consideró son los NAB preexistentes contra diferentes serotipos de AAV en la población general y otras posibles diferencias individuales entre los pacientes (incluyendo, sin limitación, otros tipos de respuestas inmunitarias (por ejemplo, inmunidad intracelular o inmunidad del RPE) o debido a diferencias en el genotipo (por ejemplo, diferentes mutaciones)). En este diseño, se usaron y sometieron a ensayo múltiples tipos de AAV, incluyendo los que comparten una baja reactividad cruzada con los NAB para reducir las posibles respuestas inmunitarias y maximizar el efecto terapéutico en diferentes pacientes.

Para (c), debido a que el ADNc completo de CYP4V2 tiene 1578 pb (incluyendo los codones de inicio y parada), pueden usarse diseños tanto de ssAAV como de scAAV en la terapia génica con CYP4V2. Los diseños de ssAAV y scAAV tienen cada uno sus propias ventajas y desventajas, como se describe en el presente documento. En comparación con ssAAV, un diseño de scAAV ofrece una expresión rápida y una mayor estabilidad del ADN. Sin embargo, su límite de empaquetamiento (aproximadamente 2,4-2,5 kb) restringe el uso de secuencias reguladoras de mayor tamaño y potencialmente más activas (por ejemplo, promotor, señal de PoliA). Asimismo, dependiendo del tamaño del promotor utilizado, es posible que un diseño de scAAV deba acortarse o prescindir de algunas secuencias reguladoras opcionales (por ejemplo, un potenciador). Se diseñaron y generaron vectores de ssAAV y scAAV para su uso en la terapia génica con CYP4V2. Se generaron diversos AAV pseudotipados que contenían genoma de AAV2 (por ejemplo, las ITR de AAV2 (SEQ ID NO: 42 y 43) y una cápside de cada uno de los tipos de AAV descritos en (b) anteriormente. Para el scAAV, una de las dos ITR de AAV2 se truncó/mutó (SEQ ID NO: 44).

Para (d), como se analiza en el presente documento, existen múltiples proteínas CYP4V2 funcionales. Además, numerosas secuencias de ácidos nucleicos pueden codificar la misma proteína. En el estudio se generaron tres (3) ADNc; el primero (SEQ ID NO: 1, denominado CYP4V2st) que codifica la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4), el segundo es un ADNc con codones optimizados (SEQ ID NO: 2, denominado CYP4V2op) que codifica la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4) y el tercero (SEQ ID NO: 3, denominado CYP4V2fv) que codifica una

variante funcional de la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 5). Se insertó una secuencia Kozak (secuencias de ejemplo mostradas en la SEQ ID NO: 37 o 38) antes del codón de inicio del ADNc.

Para (e), de forma similar al razonamiento en (b), el promotor necesita funcionar bien para impulsar la expresión en las células diana (por ejemplo, células RPE cuando el tipo celular diana para el tratamiento es RPE, células de la córnea cuando el tipo celular diana son las células de la córnea). El promotor es un elemento importante en el casete de expresión de los vectores de terapia génica. La selección óptima del promotor puede potenciar la especificidad de la diana y la expresión génica. Dependiendo del tipo o tipos de células o tejidos diana del tratamiento, el promotor utilizado en la terapia génica con CYP4V2 puede ser un promotor constitutivo o un promotor con especificidad celular (por ejemplo, un promotor específico de células RPE, un promotor específico tanto de RPE como de fotorreceptores, un promotor específico de células RPE y de células coroides, un promotor específico de células del RPE, fotorreceptoras y coroides, un promotor específico de células de la córnea, un promotor específico de células del RPE, fotorreceptoras y coroides y de la córnea, o un promotor específico de células oculares). Debido a que CYP4V2 se expresa casi ubicuamente y múltiples tipos celulares se ven afectados en la BCD (siendo el principal RPE, otros tipos celulares incluyen, por ejemplo, córnea, retina, linfocitos), en este diseño se eligieron promotores constitutivos para ampliar el efecto del casete de expresión y el vector de suministro en múltiples tipos de tejidos y células. Para el casete de expresión utilizado en vectores de ssAAV, se usó un promotor constitutivo fuerte, el promotor CAG que tiene ~1,7 kb de longitud (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 32). El promotor CAG (también conocido como promotor CBA, CAGGS o CB) es un promotor sintético fuerte. El promotor CAG se compone de los siguientes elementos reguladores: (C) elemento potenciador temprano del citomegalovirus (CMV); (A) la región promotora y el primer exón del gen de la beta-actina de pollo, y un intrón quimérico del gen de la beta-actina de pollo y el gen de la beta-globina de conejo, y (G) el aceptor de corte y empalme del gen de la beta-globina de conejo. Se usó el promotor CAG porque tiene una actividad más fuerte y más duradera que el promotor CMV (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 40), que es el promotor constitutivo más habitualmente utilizado para impulsar la expresión en células de mamíferos. Para el casete de expresión utilizado en vectores de scAAV, debido a la limitación del tamaño del empaquetamiento de scAAV, se usó un promotor constitutivo mucho más corto, el promotor del factor de elongación 1 alfa corto (EFS) (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 35). El promotor EFS es la versión miniaturizada del promotor EF-1 alfa (~1,2 Kb, secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 41). El promotor EF-1 alfa es un promotor constitutivo derivado del factor de elongación humano 1 alfa (EF-1 α). El promotor EFS también puede usarse en el diseño del casete de expresión para ssAAV. Además del promotor CAG, promotor CMV, promotor EF1 alfa y promotor EFS, pueden usarse otros promotores constitutivos, incluyendo, sin limitación, otro promotor vírico tal como el promotor CMV, un derivado o variante del CAG (también conocido como promotor CBA, CAGGS o CB) tal como el promotor smCBA, promotor CB^{SB} o el promotor CBh, otro promotor de beta-actina tal como el promotor de beta actina humana, un derivado o variante del promotor alfa EF-1, promotor PGK, el promotor UBC, el promotor GUSB, el promotor UCOE u otros promotores descritos en el presente documento. Además, puede usarse un promotor con especificidad celular, incluyendo, sin limitación, los promotores específicos de células oculares descritos en el presente documento, por ejemplo, un promotor VMD2 (también conocido como BEST1) o un promotor RPE65 para impulsar la expresión en RPE.

Para (f), se usó una poliA de bGH (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 34) para el diseño del casete de expresión utilizado en ssAAV y una señal de poliA más corta, una poliA pequeña (SPA) (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 36) para el diseño del casete de expresión utilizado en scAAV. El SPA también puede usarse en casetes de expresión para ssAAV. En su lugar también pueden usarse otras señales de poliA (incluyendo derivados o variantes), incluyendo, sin limitación, una señal poliA de SV40, una señal de poliA tardía de SV40 (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 39) u otras señales de poliA como se describen en el presente documento, incluyendo, sin limitación, una señal de poliA utilizada en combinación con un potenciador en dirección 5' (USE).

Para (g), se usó un potenciador WPRE (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 33) para el casete de expresión utilizado en ssAAV. Para el diseño de casetes de expresión utilizados en scAAV, dado el límite de tamaño, no se incluyó un potenciador. Cabe señalar que un potenciador es opcional en los casetes de expresión de CYP4V2 de ssAAV y scAAV. También cabe señalar, sin embargo, que es posible incluir secuencias de potenciadores de longitud corta, por ejemplo, un WPRE acortado que contiene elementos gamma y alfa mínimos del WPRE, en combinación con un promotor y una señal de poliA de tamaño pequeño en el casete de expresión de CYP4V2 de scAAV. Además de WPRE, pueden usarse otros potenciadores como se describen en el presente documento, tales como un potenciador HPRE o un potenciador CTE.

En algunos casos, el casete de expresión de CYP4V2 incluye un promotor (por ejemplo, un promotor CAG (también conocido como CBA, CAGGS, CB), un promotor EF-1 alfa, un promotor smCBA, un promotor CBh, un promotor EFS, un promotor de beta-actina humana, un promotor CMV, un promotor VMD2 o un promotor RPE65), una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína CYP4V2 funcional (por ejemplo, un ADNc que codifica la proteína CYP4V2 humana o una variante o fragmento funcional de la misma), opcionalmente unido con una secuencia de potenciador (por ejemplo, un potenciador WPRE, un potenciador HPRE o un potenciador CTE) y una señal de poliA (por ejemplo, una poliA de bGH, una SPA o una PoliA de SV40, o un fragmento o derivado de las mismas, por ejemplo, una poliA tardía de SV40) y otras secuencias reguladoras (por

ejemplo, una secuencia Kozak). Véanse las SEQ ID NO: 1-41 para consultar secuencias de ejemplo.

Se entenderá que (i) las secuencias de ejemplo de diversas secuencias reguladoras proporcionadas en la sección SEQ son de naturaleza de ejemplo y existen diferentes versiones de estas secuencias reguladoras que pueden lograr la misma o similar función, y (ii) existen diferentes variantes, fragmentos y/o derivados de estas secuencias que también pueden usarse, por ejemplo, un promotor CAG truncado, un potenciador WPRE acortado, una poliA tardía de SV40.

Basándose en el enfoque de diseño descrito anteriormente, se generaron múltiples ADNc de CYP4V2, casetes de expresión de CYP4V2 y vectores de rAAV para su uso en la terapia génica con CYP4V2, incluyendo:

(1) Tres ADNc de CYP4V2 como se muestra en las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente. CYP4V2st (SEQ ID NO: 1) y CYP4V2op (SEQ ID NO: 2) codifican la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4). CYP4V2fv (SEQ ID NO: 3) codifica una variante funcional de la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 5);

(2) Dos casetes de expresión de CYP4V2 (CYP4V2 indica una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína CYP4V2 humana o una proteína CYP4V2 funcional. Véase la Figura 7 para consultar un dibujo esquemático):

- (i) CAG-CYP4V2-WPRE-poliA de bGH
- (ii) EFS-CYP4V2-SPA

(3) Los ADNc de CYP4V2 y los casetes de expresión de CYP4V2 mencionados anteriormente se empaquetaron en seis vectores de AAV diferentes (AAV2, AAV5, AAV8, AAV1, AAV2(Y444F+Y500F+Y730F) y AAV9) para crear los siguientes vectores de rAAV que contienen un ADNc de CYP4V2 y un casete de expresión, incluyendo construcciones de vectores de ssAAV y scAAV:

- (i) AAV2/2-CAG-CYP4V2op-WPRE-poliA de bGH recombinante (en el presente documento denominado AAV2.CYP4V2op),
- (ii) AAV2/2 (Y444F+Y500F+Y730F)-CAG-CYP4V2op-WPRE-PoliA de bGH recombinante (en el presente documento denominado AAV2tri(Y-F).CYP4V2op o AAV2tri.CYP4V2op),
- (iii) AAV2/5-CAG-CYP4V2op-WPRE-PoliA de bGH recombinante (denominado en el presente documento AAV5.CYP4V2op).
- (iv) AAV2/5-CAG-CYP4V2st-WPRE-poliA de bGH recombinante (en el presente documento denominado AAV5.CYP4V2st),
- (v) AAV2/8-CAG-CYP4V2fv-WPRE-poliA de bGH recombinante (en el presente documento denominado AAV8.CYP4V2fv),
- (vi) AAV2/1-EFS-CYP4V2op-SPA recombinante autocomplementario (en el presente documento denominado scAAV1.CYP4V2op),
- (vii) AAV2/5-EFS-CYP4V2op-SPA recombinante autocomplementario (en el presente documento denominado scAAV5.CYP4V2op) y
- (viii) AAV2/9-EFS-CYP4V2op-SPA recombinante autocomplementario (en el presente documento denominado scAAV9.CYP4V2op).

Cuando se empaqueta en un vector de rAAV, el casete de expresión estaba flanqueado por dos ITR de AAV2 (SEQ ID NO: 42 y 43). Para scAAV, una de las ITR de AAV2 se truncó/mutó (SEQ ID NO: 44). Se entenderá que también puede usarse genoma no de AAV2, incluyendo ITR no de AAV2 para empaquetar el casete de expresión. Se insertó una secuencia Kozak (SEQ ID NO: 37 o 38) inmediatamente antes de los ADNc de CYP4V2. Véase la Figura 7 para consultar dibujos esquemáticos que muestran el diseño de estos casetes de expresión. Se apreciará que un ADNc de CYP4V2 puede empaquetarse en diferentes casetes de expresión y que un casete de expresión de CYP4V2 puede empaquetarse en diferentes vectores de AAV. Por ejemplo, el ADNc de CYP4V2op puede usarse tanto en el casete de expresión CAG-CYP4V2-WPRE-PoliA de bGH como en el casete de expresión EFS-CYP4V2-SPA. El casete de expresión CAG-CYP4V2-WPRE-PoliA de bGH o el casete de expresión EFS-CYP4V2-SPA se pueden empaquetar en cualquier vector de AAV adecuado, incluyendo, pero sin limitación, AAV1, AAV2, AAV2(Y444F+Y500F+Y730F), AAV5, AAV8, AAV8 (Y733F), AAV9, AAV6, AAV7, AAV4, AAV12, AAV-PHP.B y otros vectores. Puede usarse un diseño de scAAV en cualquier vector de AAV adecuado para crear un vector de scAAV recombinante, por ejemplo, scAAV1, scAAV2, scAAV2(Y444F+Y500F+Y730F), scAAV5, scAAV8, scAAV8 (Y733F), scAAV3, scAAV4, scAAV6, scAAV7, scAAV9, scAAV12, etc.

Se entenderá que puede usarse un proceso de diseño similar en el diseño de otros vectores (por ejemplo, un vector de lentivirus o un plásmido) para la terapia génica con CYP4V2. Dependiendo del tipo del vector, determinados elementos descritos anteriormente pueden no ser necesarios o pueden necesitar ser ajustados en consecuencia, por ejemplo, una secuencia de promotor.

Además de los ADNc, secuencias reguladoras y tipos y diseños de AAV especificados en el presente documento, también pueden usarse otras opciones de diseño para cada elemento clave del casete de expresión y vector de suministro CYP4V2. En la sección de Ejemplos se proporciona un ejemplo sobre cómo comparar la eficiencia de

transducción de diversos tipos de AAV y la fuerza de diferentes promotores en un tipo celular diana. Pueden usarse métodos similares para evaluar y comparar las opciones de diseño de otros elementos clave del casete de expresión y del vector de suministro, por ejemplo, ADNc, potenciador, señal de poliA, ssAAV frente a scAAV, AAV frente a HSV, etc. Además, como se proporciona en el presente documento, la eficiencia de un casete de expresión de CYP4V2 y un vector de suministro puede evaluarse y compararse mediante ensayos en un modelo celular de BCD, por ejemplo, células iPS-RPE de pacientes con BCD, con los métodos descritos en el presente documento y/u otros métodos para evaluar anomalías bioquímicas, función o atrofia del RPE.

Los ADNc de CYP4V2, los casetes de expresión y los vectores de suministro descritos anteriormente se sometieron a ensayo en estirpes celulares de iPS-RPE humanas específicas de paciente con BCD, y los resultados se muestran y analizan en los siguientes Ejemplos.

Asimismo, las secuencias de unión/enlazador entre diversas secuencias reguladoras (incluyendo, sin limitación, entre ITR y un promotor, entre un potenciador y una señal de poliA o entre una señal de poliA e ITR), o entre una secuencia reguladora y un ADNc (incluyendo, sin limitación, entre un promotor y un ADNc, entre un ADNc y un potenciador o entre un ADNc y una señal de poliA) también pueden desempeñar un papel en la regulación de la expresión del gen diana (por ejemplo, CYP4V2). Las secuencias de diferentes casetes de expresión de CYP4V2 (incluyendo las ITR y las secuencias de unión/enlazador) utilizadas en el estudio se enumeran en el Ejemplo 11 a continuación.

A continuación, se proporcionan secuencias de ejemplo de determinadas secuencias reguladoras y secuencias ITR analizadas en este Ejemplo:

SEQ ID NO: 32 (promotor CAG, 1715 pb)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGC
CCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACG
ACCCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCA
TTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCAT
ATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGT
ACATGACCTTATGGGACTTTCTTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCAT
GGGTGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCCCCAAT
TTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGTCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGCGCGC
GCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGCAGCC
AATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCCCTATA
AAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTCGCTGCGTTGCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGC
CGCCTCGCGCCGCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGAC
GGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAAATGACGGCTCGTTTCTTTCTGTGGC
TGCGTGAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTG
CGTGCGTGTGTGTGTGCGTGCGGAGCGCCGCTGCGGCCCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGC
TGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGGAGGGGAGCGCGGCCGGGGGCGG
TGCCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGG
GGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAG
TTGCTGAGCACGGCCCGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGT
GCCGGGCGGGGGGTGGCGGAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGCCGGGGAG
GGCTCGGGGGAGGGGCGCGCGGCCCGGAGCGCGGCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAG
CCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGGCGG
AGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCGCACCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCC
GGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTGC CGCGCGCCGCTCCCTTCTCCATC
TCCAGCCTCGGGGCTGCCGAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTT
GGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTT
TCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAA

SEQ ID NO: 33 (potenciador WPRE, 589 pb)

AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGC
TCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATG
GCTTTTCATTTTCTCCTCCTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCG
TTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCAT
TGCCACCACCTGTGAGCTCCTTTCCGGGACTTTGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAA
CTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCG
TGGTGTGTCGGGGAAATCATCGTCCTTTTCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCT
GCGCGGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGC
CTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCC
TTTGGGCCGCTCCCCGC

SEQ ID NO: 34 (poliA de bGH, 225 pb)

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACC
CTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGA
GTAGGTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGA
CAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGG

SEQ ID NO: 35 (promotor EFS, 235 pb)

g attggctccg gtgcccgtca gtgggcagag cgcacatcgc ccacagtccc
cgagaagttg gggggagggg tccgcaattg aaccggtgcc tagagaaggt
ggcgcggggt aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt
cccgaggggtg ggggagaacc gtatataagt gcagtagtcg ccgtgaacgt
tctttttcgc aaccgggttg ccgccagaac acag

SEQ ID NO: 36 (SPA, 54 pb)

GATCCAATAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG

SEQ ID NO: 37 (secuencia Kozak, 6 pb)

GCCACC

SEQ ID NO: 38 (secuencia Kozak, 5 pb)

CCACC

SEQ ID NO: 39 (PoliA tardía de SV40, 120 pb)

TTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAAA
TAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAT

SEQ ID NO: 40 (promotor CMV, 576 pb)

TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATA
ACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATG
ACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTAC
GGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCTACT
TGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCA
ATGGGCGTGGATAGCGGTTTGAATCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGG
GAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAGTGTGTAACAACCTCCGCCCCATTG
ACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTGTGTAACC
GTCAG

SEQ ID NO: 41 (promotor EF-1 alfa, 1184 pb)

cgtgagggtccgggtgcccgctcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtcctccgagaag
 ttgggggggaggggtcggaattgaaccgggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaa
 gtgatgtcgtgtaactggctccgctttttcccgaggggtgggggagaaccgtatataagtgacgt
 agtcgccgtgaacgtttcttttcgcaacgggtttgcccgcagaaacacaggtaagtgccgtgtgt
 ggttcccgcggggctggcctctttacgggttatggcccttgctgcttgaattacttccacct
 ggctgcagtagctgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcgaggcc
 ttgctgcttaaggagcccccttcgctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggctggggccgc
 cgcgtgcgaatctggtggcaccttcgcgctgtctcgtgctttcgataagttcttagccattt
 aaaatttttgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaagatagttctgtaaatgcgggcca
 agatctgcacactggtatttcggtttttggggccgcgggcggcgacggggcccgctgcgtccag
 cgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcgagcggggtagtctc
 aagctggccggcctgctctggtgcttggcctcgcgcgcgctgtatcgccccgcccctgggcggc
 aaggtggcccggtcgccaccagttgctgagcggaaagatggccgcttcccgccctgctgca
 gggagctcaaatggaggacgcggcgtcgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaagga
 aaaggccctttccgctcctcagccgtcgttcatgtgactccacggagtaccgggcgcgctccag
 gcacctcgattagttctcgagcttttgagtagctcgtcttttaggttggggggaggggttttat
 gcgatggagtttccccacactgagtggtggagactgaagttaggccagcttggcacttgatgt
 aattctccttgggaatttgcccttttgagtttggtatcttggttcattctcaagcctcagacagt
 ggttcaaagtttttttcttccatttcaggtgctgta

SEQ ID NO: 42 (ITR izquierda 5' de AAV2, 141 pb)

5 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag
 cccgggcgtc gggcgacctt tggcgcccgc gctcagtgga gcgagcgagc
 gcgcagagag ggagtggcca actccatcac taggggttcc t

SEQ ID NO: 43 (ITR derecha 3' de AAV2, 141 pb)

10 ag gaacccttag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg ctcgctcgtc
 cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccgc acgcccgggc tttgcccggg
 cggcctcagt gacgcagcga gcgcgcagct gctgcagg

SEQ ID NO: 44 (ITR 5' de AAV2 mutante en construcción de scAAV, 117 pb)

15 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag
 cccgggcgtc gggcgacctt tggcgcccgc gctcagtgga gcgagcgagc
 gcgcagagag ggagtgg

15 SEQ ID NO: 45 (ITR 3' de AAV2 en construcción de scAAV, 141 pb)

aggaacc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgtc
 cgctcactga ggccgggcga ccaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc
 cgggcggcct cagtgcgcga gcgagcgcg agctgcctgc agg

20 Ejemplo 10 - Métodos de uso del modelo celular de BCD para someter a ensayo, comparar y cribar serotipos de AAV y estructura de la cápside, actividad del promotor y otras secuencias reguladoras y niveles de expresión de ADNc, así como la eficacia global y los niveles de dosificación de un vector en la terapia génica con CYP4V2 y para evaluar el vector y la dosificación óptimos personalizados para diferentes pacientes

25 El modelo celular de BCD (por ejemplo, estirpes celulares de iPS-RPE específicas de paciente con BCD, o estirpes celulares de ES-RPE, iPS-RPE o RPE con mutaciones de CYP4V2 generadas artificialmente) puede usarse en el cribado de fármacos y dosificación. Se usaron muestras de iPS-RPE específicas de paciente con BCD para someter a ensayo, comparar y cribar diversos componentes y dosificación para la terapia génica con CYP4V2, incluyendo el tipo de vector (por ejemplo, serotipos de AAV y estructura de la cápside), promotor, potenciador, señal de poliA y otras secuencias en el casete de expresión de CYP4V2 y el ADNc de CYP4V2, así como la eficacia global y los niveles de dosificación de un vector. Se usó el rescate de fenotipo para someter a ensayo y comparar la eficacia.

35 Pueden someterse a ensayo vectores de diferente serotipo (por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV5, AAV8, AAV9) o cápside (por ejemplo, AAV con una o más mutaciones de la cápside, por ejemplo, AAV2 frente a AAV2tri(Y-F)) o estructura (por ejemplo, scAAV frente a ssAAV), y compararse usando diferentes vectores con el mismo casete de expresión. Por ejemplo, AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op y AAV5.CYP4V2op tienen el mismo casete de

expresión, pero son diferentes en el serotipo/cápside de AAV. scAAV1.CYP4V2op, scAAV5.CYP4V2op y scAAV9.CYP4V2op comparten el mismo casete de expresión, pero son diferentes en el serotipo de AAV. Los resultados del rescate de fenotipo pueden usarse para someter a ensayo y comparar el serotipo/cápside de AAV (por ejemplo, AAV2 frente a AAV2tri(Y-F) frente a AAV5) y la estructura (por ejemplo, scAAV5 frente a ssAAV5) y la diferencia de eficiencia en la transducción y suministro del ADNc de CYP4V2 a células RPE de pacientes con BCD.

Puede usarse el mismo método para someter a ensayo y comparar el nivel de actividad de diferentes casetes de expresión, ADNc o secuencias reguladoras u otras secuencias (por ejemplo, secuencias de unión/enlazador) sometiendo a ensayo la eficacia de rescate de fenotipo de vectores de rAAV de la misma construcción (excepto el elemento que se está sometiendo a ensayo y comparando).

Además, como se describe en los Ejemplos del presente documento, pueden aplicarse diferentes dosificaciones (por ejemplo, 1×10^4 y 1×10^5) del mismo vector (por ejemplo, vector de rAAV, por ejemplo, scAAV1.CYP4V2op) a muestras de iPS-RPE del mismo paciente para evaluar el intervalo de dosificación terapéutica eficaz (medido mediante MOI por célula).

Asimismo, dado que el modelo celular de BCD presentó diferencias individuales, también puede usarse para evaluar y descubrir la dosis óptima personalizada y la construcción de vectores para cada paciente individualmente. Véanse los Ejemplos relacionados y la divulgación del presente documento para consultar un análisis más detallado.

Ejemplo 11 - Generación de diversos vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) que portan un casete de expresión y una secuencia de ácido nucleico que codifican una CYP4V2 funcional

Se fabricaron a medida diversos vectores de AAV.CYP4V2 diseñados para este estudio (véanse Ejemplos en el presente documento), incluyendo AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op, AAV5.CYP4V2st, AAV5.CYP4V2op, AAV8.CYP4V2fv y scAAV1.CYP4V2op, en Vector BioLabs (Malvern, PA, EE.UU.). Los vectores de AAV recombinantes de Vector BioLabs no tienen auxiliar. El proceso de producción implica: (1) clonar un plásmido cis de pAAV, que es un plásmido que contiene ITR de AAV2 e incluye el ADNc de CYP4V2 pertinente (es decir, CYP4V2st, CYP4V2op o CYP4V2fv) y secuencias reguladoras de un casete de expresión de CYP4V2, (2) preparación a gran escala de plásmido cis de pAAV y plásmidos suplementarios (un plásmido que porta los genes Rep-Cap de AAV pertinentes y un plásmido que proporciona los genes auxiliares aislados de adenovirus) mediante el uso del kit Qiagen Endo-free Mega Prep, (3) cotransfección a gran escala de los tres plásmidos descritos anteriormente en placas de células HEK293. (4) Dos días después de las transfecciones, se recogieron sedimentos celulares y se liberaron los virus usando tres ciclos de congelación/descongelación. Los virus AAV se purificaron mediante ultracentrifugación en gradiente de CsCl, seguido de desalación y (5) el título vírico (copias de genoma (GC)/ml) se determinó mediante PCR en tiempo real. Los vectores de rAAV purificados se almacenaron a -80°C hasta su uso.

A continuación, se enumeran las secuencias de diferentes casetes de expresión de CYP4V2 (incluyendo las ITR y las secuencias de unión/enlazador) empaquetadas en diversos vectores de AAV.CYP4V2 para el estudio.

SEQ ID NO: 60 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op y AAV5.CYP4V2op.:

ITR-Izquierda: 1-141
 Promotor CAG: 237-1951
 ADNc de CYP4V2op: 2002-3579
 Potenciador WPRE: 3736-4324
 polII de bGH: 4350-4574
 ITR-Derecha 4659-4799

ES 2 985 828 T3

```

1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
51 CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTC TGCGGCCAAT
151 TCAGTCGATA ACTATAACGG TCCTAAGGTA GCGATTTAAA TACGCGCTCT
201 CTTAAGGTAG CCCCGGGACG CGTCAATTGA GATCTCGACA TTGATTATTG
251 ACTAGTTATT AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCCATATA
301 TATGGAGTTC CGCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCG CCTGGCTGAC
351 CGCCCAACGA CCCCCGCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTCCCATATA
401 GTAACGCCAA TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG ACTATTTACG
451 GTAAACTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC
501 CCCCTATTGA CGTCAATGAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCA TTATGCCCAG
551 TACATGACCT TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT
601 CATCGCTATT ACCATGGGTC GAGGTGAGCC CCACGTTCTG CTTCACTCTC
651 CCCATCTCCC CCCCCTCCCC ACCCCCAATT TTGTATTTAT TTATTTTTTA
701 ATTATTTTGT GCAGCGATGG GGGCGGGGGG GGGGGGGGCG CGCGCCAGGC
751 GGGGCGGGGC GGGGCGAGGG GCGGGGCGGG GCGAGGCGGA GAGTGTGCGG
801 GGCAGCCAAT CAGAGCGGCG CGCTCCGAAA GTTTCCTTTT ATGCGCAGGC
851 GCGGCGGCG GCGGCCCTAT AAAAAGCGAA GCGCGCGGCG GCGGGGAGTC
901 GCTGCGTTGC CTTGCGCCCC TGCCCCGCTC CGCGCCGCCT CGCGCCGCC
951 GCCCCGGCTC TGA CTGACCG CGTTACTCCC ACAGGTGAGC GGGCGGGACG
1001 GCCCTTCTCC TCCGGGCTGT AATTAGCGCT TGGTTTAATG ACGGCTCGTT
1051 TCTTTTCTGT GGCTGCGTGA AAGCCTTAAA GGGCTCCGGG AGGGCCCTTT
1101 GTGCGGGGGG GAGCGGCTCG GGGGGTGCCT GCGTGTGTGT GTGCGTGGGG
1151 AGCGCCGCGT GCGGCCGCG CTGCCCCGCG GCTGTGAGCG CTGCGGCGC
1201 GCGCGGGGCG TTTGTGCGCT CCGCGTGTGC GCGAGGGGAG CGCGGCCGG
1251 GCGGCTGCC CGCGGTGCG GGGGGCTGCG AGGGGAACAA AGGCTGCGTG
1301 CGGGCTGTGT GCGTGGGGG GTGAGCAGGG GGTGTGGGCG CGCGGTCGG
1351 GCTGTAACCC CCCCCTGCAC CCCCCTCCCC GAGTTGCTGA GCACGGCCCG
1401 GCTTCGGGTG CGGGGCTCCG TGCGGGGCGT GCGCGGGGCG TCGCGTGCC
1451 GGGCGGGGGG TGGCGGCAGG TGGGGGTGCC GGGCGGGGCG GGGCCGCTC
1501 GGGCCGGGGA GGGCTCGGGG GAGGGGCGCG GCGGCCCCCG AGCGCCGGCG
1551 GCTGTCGAGG CGCGGCGAGC CGCAGCCATT GCCTTTTATG GTAATCGTGC
1601 GAGAGGGGCG AGGGACTTCC TTTGTCCCAA ATCTGGCGGA GCCGAAATCT
1651 GGGAGGCGCC GCCGCACCCC CTCTAGCGGG GCGGGGCGAA GCGGTGCGGC
1701 GCCGGCAGGA AGGAAATGGG CGGGGAGGGC CTTCTGTCGT CGCCGCGCCG
1751 CCGTCCCCCT CTCCATCTCC AGCCTCGGGG CTGCGCGAGG GGGACGGCTG
1801 CCTTCGGGGG GGACGGGGCA GGGCGGGGTT CGGCTTCTGG CGTGTGACCG
1851 GCGGCTCTAG AGCCTCTGCT AACCATGTTT ATGCCTTCTT CTTTTTCCTA
1901 CAGCTCCTGG GCAACGTGCT GGTATTGTG CTGTCTCATC ATTTTGCCAA
1951 AGAATTCTAA TACGACTCAC TATAGGGAGA CCCAAGCTGG CTAGAGCCAC
2001 CATGGCTGGA CTGTGGCTGG GACTGGTGTG GCAGAACTG CTGTGTGGG
2051 GGGCCGCTTC CGCACTGTCA CTGGCTGGGG CTTCACTGGT GCTGAGCCTG
2101 CTGCAGAGGG TGGCTCCTA CGCCAGAAAG TGGCAGCAGA TGAGGCCCAT

```

ES 2 985 828 T3

```

2151 CCCTACCGTG GCCAGAGCCT ATCCACTGGT GGGACACGCA CTGCTGATGA
2201 AGCCTGACGG CAGAGAGTTC TTTCAGCAGA TCATCGAGTA CACAGAGGAG
2251 TATAGGCACA TGCCACTGCT GAAGCTGTGG GTGGGACCCG TGCCATGGT
2301 GGCCCTGTAC AACGCCGAGA ATGTGGAAGT GATCCTGACC AGCAGCAAGC
2351 AGATCGATAA GTCTAGCATG TATAAGTTCC TGGAGCCTTG GCTGGGCCCTG
2401 GGCCCTGCTGA CCTCTACAGG CAACAAGTGG AGGAGCCGGA GAAAGATGCT
2451 GACCCCAACA TTCCACTTTA CAATCCTGGA GGACTTCCTG GACATCATGA
2501 ACGAGCAGGC CAATATCCTG GTGAAGAAGC TGGAGAAGCA CATCAACCAG
2551 GAGGCCTTTA ATTGCTTCTT TTACATCACC CTGTGCGCCC TGACATCAT
2601 CTGTGAGACA GCTATGGGCA AGAACATCGG CGCCAGTCT AATGACGATA
2651 GCGAGTACGT GCGGGCCGTG TATAGAATGA GCGAGATGAT CTTTAGGCGC
2701 ATCAAGATGC CCTGGCTGTG GCTGGATCTG TGGTATCTGA TGTTCAGGA
2751 GGGCTGGGAG CACAAGAAGT CCCTGCAGAT CCTGCACACC TTTACAAACT
2801 CTGTGATCGC CGAGAGAGCC AATGAGATGA ACGCCAATGA GGACTGTAGG
2851 GGCGATGGAA GGGGCAGCGC CCCTTCCAAG AACAAGCGGA GAGCCTTCCT
2901 GGACCTGCTG CTGAGCGTGA CCGACGATGA GGGCAATCGC CTGTCCACG
2951 AGGACATCCG GGAGGAGGTG GATACATTCA TGTTTGAGGG ACACGACACC
3001 ACAGCCGCGG CCATCAACTG GTCCCTGTAC CTGCTGGGCT CTAATCCAGA
3051 GGTGCAGAAG AAGGTGGATC ACGAGCTGGA CGACGTGTTC GGCAGTCCG
3101 ACAGGCCAGC AACCGTGGAG GATCTGAAGA AGCTGAGATA CCTGGAGTGC
3151 GTGATCAAGG AGACACTGCG CCTGTTCCCC TCTGTGCCTC TGTTCGCCG
3201 GTCCGTGTCT GAGGACTGTG AGGTGGCCGG CTATCGCGTG CTGAAGGGCA
3251 CCGAGGCCGT GATCATCCCT TACGCCCTGC ACCGGGACCC CAGGTATTTT
3301 CCTAACCCAG AGGAGTTTCA GCCAGAGAGA TTCTTTCCCG AGAATGCCCA
3351 GGGCAGGCAC CCTTACGCCCT ATGTGCCATT CTCCGCCGGA CCAAGGAACT
3401 GCATCGGACA GAAGTTTGCC GTGATGGAGG AGAAAACCAT CCTGTCTTGT
3451 ATCCTGAGAC ACTTCTGGAT CGAGAGCAAT CAGAAGAGGG AGGAGCTGGG
3501 CCTGGAGGGA CAGCTGATCC TGCGGCCAAG CAACGGCATC TGGATCAAAC
3551 TGAAGAAGG GAACGCTGAC GAGAGGTAAA AGCTTGGTAC CGATATCGCG
3601 GCCGCCCTAG GGAGCTCCTC GAGGCGGCCG GCTCGAGTCT AGAGGGCCCT
3651 TCGAAGGTAA GCCTATCCCT AACCCCTCTC TCGGTCTCGA TTCTACGCGT
3701 ACCGGTCATC ATCACCATCA CCATTGAGTT TCGATAATCA ACCTCTGGAT
3751 TACAAAATTT GTGAAGATT GACTGGTATT CTTAACTATG TTGCTCCTTT
3801 TACGCTATGT GGATACGCTG CTTTAATGCC TTTGTATCAT GCTATTGCTT
3851 CCCGTATGGC TTTCATTTTC TCCTCCTTGT ATAAATCCTG GTTGCTGTCT
3901 CTTTATGAGG AGTTGTGGCC CGTTGTGCTG CAACGTGGCG TGGTGTGCAC
3951 TGTGTTTGTG GACGCAACCC CCACTGGTTG GGGCATTGCC ACCACCTGTC
4001 AGCTCCTTTC CGGGACTTTC GCTTTCCCCC TCCCTATTGC CACGGCGGAA
4051 CTCATCGCCG CCTGCCCTTG CCGCTGCTGG ACAGGGGCTC GGCCTGTTGG
4101 CACTGACAAT TCCGTGGTGT TGTGCGGGAA ATCATCGTCC TTTCTTGGC
4151 TGCTCGCCTG TGTTGCCACC TGGAATTCTG GCGGGACGTC CTTCTGCTAC
4201 GTCCCTTCGG CCCTCAATCC AGCGGACCTT CCTTCCCGCG GCCTGCTGCC
4251 GGCTCTGCGG CCTCTTCGCG GTCTTCGCTT TCGCCCTCAG ACGAGTCGGA
4301 TCTCCCTTTG GGCCGCTTCC CCGCATCGAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC
4351 TGTGCTTCTT AGTTGCCAGC CATCTGTTGT TTGCCCCTCC CCCGTGCCCT
4401 CCTTGACCCCT GGAAGGTGCC ACTCCCACTG TCCTTTCTTA ATAAATGAG
4451 GAAATTGCAT CGCATGTCT GAGTAGGTGT CATTCTATTC TGGGGGGTGG
4501 GGTGGGGCAG GACAGCAAGG GGGAGGATTG GGAAGACAAT AGCAGGCATG
4551 CTGGGGATGC GGTGGGCTCT ATGCCTTCTG AGGCGGAAAG AACCAGATCC
4601 TCTCTTAAGG TAGCATCGAG ATTTAAATTA GGGATAACAG GGTAATGGCG
4651 CGGGCCGCAG GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG
4701 CTCGCTCGCT CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTGCGCCG ACGCCCGGGC
4751 TTTGCCCGGG CGGCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

```

SEQ ID NO: 61 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en AAV5.CYP4V2st. AAV5.CYP4V2st tiene el mismo promotor (CAG), potenciador (WPRE) y poliA (poliA-bGH) que AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op y AAV5.CYP4V2op (SEQ ID NO: 60) pero secuencias de ADNc y unión/enlazador de CYP4V2 diferentes:

ITR-Izquierda: 1-141
 Promotor CAG: 166-1880
 ADNc de CYP4V2st: 1938-3515
 Potenciador WPRE: 3551-4139
 poliA de bGH: 4163-4387
 ITR-Derecha: 4399-4539

ES 2 985 828 T3

```

1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
51 CCCGGGCGTC GGGGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTC TGCGGCCTAA
151 GGCAATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA
201 ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTC GCGTTACATA
251 ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCGCGCCCAT
301 TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC
351 CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTGGCAGT
401 ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACG
451 GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT
501 CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTCG
551 AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTCACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCCA
601 CCCCCAATTT TGTATTATT TATTTTTTAA TTATTTTGTG CAGCGATGGG
651 GCGGGGGGGG GGGGGGGCGC GCGCCAGGCG GGGCGGGGCG GGGCCAGGGG
701 CGGGGCGGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGCGC
751 GCTCCGAAAG TTTCCCTTTA TGGCGAGGCG GCGGCGGCGG CGGCCCTATA
801 AAAAGCGAAG CGCGCGGCGG GCGGGAGTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCGT
851 GCCCCGCTCC GCGCCGCTC GCGCGGCCG CCGCGGCTCT GACTGACCGC
901 GTTACTCCCA CAGGTGAGCG GCGGGGACG CCCTTCTCCT CCGGGCTGTA
951 ATTAGCGCTT GGTTTAATGA CGGCTCGTTT CTTTTCTGTG GCTGCGTGAA
1001 AGCCTTAAAG GGCTCCGGGA GGGCCCTTTG TGCGGGGGGG AGCGGCTCGG
1051 GGGGTGCGTG CGTGTGTGTG TGCGTGGGGA GCGCCGCGTG CGGCCCGCGC
1101 TGCCCGGCGG CTGTGAGCGC TGCGGGCGCG GCGCGGGGCT TTGTGCGCTC
1151 CGCGTGTGCG CGAGGGGAGC GCGGCCGGGG GCGGTGCCCG GCGGTGCGGG
1201 GGGGCTGCGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGGG
1251 TGAGCAGGGG GTGTGGGCGC GGCGGTCGGG CTGTAACCCC CCCCTGCACC
1301 CCCCTCCCCG AGTTGTGTAG CACGGCCCGG CTTGCGGTGC GGGGCTCCGT
1351 GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT CGCCGTGCCG GCGGGGGGGT GCGGCGAGGT
1401 GGGGGTGCCG GCGGGGCGCG GGCCGCCTCG GGCCGGGGAG GGCTCGGGGG
1451 AGGGGCGCGG CGGCCCCGGA GCGCCGCGCG CTGTCGAGGC GCGGCGAGCC
1501 GCAGCCATTG CCTTTTATGG TAATCGTGCG AGAGGGCGCA GGGACTTCCT
1551 TTGTCCCAAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGCGCCCG CCGCACCCCC
1601 TCTAGCGGGC GCGGGCGAAG CGGTGCGGCG CCGGCAGGAA GGAAATGGGC
1651 GGGGAGGGCC TTCGTGCGTC GCGCGGCCG CGTCCCCTTC TCCATCTCCA
1701 GCCTCGGGGC TGCCGCAAGG GGACGGCTGC CTTGCGGGGG GACGGGGCAG
1751 GCGGGGGTTC GGCTTCTGGC GTGTGACCGG CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA
1801 ACCATGTTCA TGCCCTCTTC TTTTTCCTAC AGCTCCTGGG CAACGTGCTG
1851 GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGGCAAA GAATTCTAAT ACGACTCACT
1901 ATAGGGAGAC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACCATG GCGGGGCTCT
1951 GGCTGGGGCT CGTGTGGCAG AAGCTGCTGC TGTGGGGCGC GCGGAGTGCC
2001 CTTTCCCTGG CCGGCGCCAG TCTGGTCTG AGCCTGCTGC AGAGGGTGCC
2051 GAGCTACGCG CGGAAATGGC AGCAGATGCG GCCCATCCCC ACGGTGGCCC
2101 GCGCCTACCC ACTGGTGGGC CACGCGCTGC TGATGAAGCC GGACGGGCGA
2151 GAATTTTTTC AGCAGATCAT TGAGTACACA GAGGAATACC GCCACATGCC
2201 GCTGCTGAAG CTCTGGGTCT GGCCAGTGCC CATGCTGGCC CTTTATAATG
2251 CAGAAAATGT GGAGGTAAT TTAAGTAGTT CAAAGCAAAT TGACAAATCC
2301 TCTATGTACA AGTTTTTAGA ACCATGGCTT GGCCTAGGAC TTCTTACAAG
2351 TACTGGAAAC AAATGGCGCT CCAGGAGAAA GATGTTAACA CCCACTTTCC
2401 ATTTTACCAT TCTGGAAGAT TTCTTAGATA TCATGAATGA ACAAGCAAAT
2451 ATATTGGTTA AGAACTTGA AAAACACATT AACCAGAAG CATTTAACTG
2501 CTTTTTTTAC ATCACTCTTT GTGCCTTAGA TATCATCTGT GAAACAGCTA
2551 TGGGGAAGAA TATTGGTGCT CAAAGTAATG ATGATTCCGA GTATGTCCGT
2601 GCAGTTTATA GAATGAGTGA GATGATATTT CGAAGAATAA AGATGCCCTG

```

ES 2 985 828 T3

```

2651 GCTTTGGCTT GATCTCTGGT ACCTTATGTT TAAAGAAGGA TGGGAACACA
2701 AAAAGAGCCT TCAGATCCTA CATACTTTTA CCAACAGTGT CATCGCTGAA
2751 CGGGCCAATG AAATGAACGC CAATGAAGAC TGTAGAGGTG ATGGCAGGGG
2801 CTCTGCCCCC TCCAAAATA AACGCAGGGC CTTTCTTGAC TTGCTTTTAA
2851 GTGTGACTGA TGACGAAGGG AACAGGCTAA GTCATGAAGA TATTCGAGAA
2901 GAAGTTGACA CCTTCATGTT TGAGGGGCAC GATACAAC TG CAGCTGCAAT
2951 AAAGTGGTCC TTATACCTGT TGGGTTCTAA CCCAGAAGTC CAGAAAAAAG
3001 TGGATCATGA ATTGGATGAC GTGTTTGGGA AGTCTGACCG TCCCGCTACA
3051 GTAGAAGACC TGAAGAACT TCGGTATCTG GAATGTGTTA TTAAGGAGAC
3101 CCTTCGCCTT TTTCTTCTG TTCCTTTATT TGCCCGTAGT GTTAGTGAAG
3151 ATTGTGAAGT GGCAGGTTAC AGAGTTCTAA AAGGCACTGA AGCCGTCATC
3201 ATTCCCTATG CATTGCACAG AGATCCGAGA TACTTCCCCA ACCCCGAGGA
3251 GTTCCAGCCT GAGCGTCTT TCCCCGAGAA TGCACAAGGG CGCCATCCAT
3301 ATGCCTACGT GCCCTTCTCT GCTGGCCCCA GGAAGTGTAT AGGTCAAAAG
3351 TTTGCTGTGA TGGGAAGAAA GACCATTCTT TCGTGCACTC TGAGGCACTT
3401 TTGGATAGAA TCCAACCAGA AAAGAGAAGA GCTTGGTCTA GAAGGACAGT
3451 TGATTCTTCG TCCAAGTAAT GGCATCTGGA TCAAGTTGAA GAGGAGAAAT
3501 GCAGATGAAC GCTAAGCGGC CGCAACTCGA GACTCTAGAG GTTAATCGAT
3551 AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
3601 CTATGTTGCT CCTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCTTTGT
3651 ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTTGTATAAA
3701 TCCTGGTTGC TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG
3751 TGGCGTGGTG TGCATGTGT TTGCTGACGC AACCCCACT GGTGGGGCA
3801 TTGCCACCAC CTGTCAGCTC CTTTCCGGGA CTTTCGCTTT CCCCCTCCCT
3851 ATTGCCACGG CGGAATCAT CGCCGCTGC CTTGCCCGCT GCTGGACAGG
3901 GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATTCCGT GGTGTTGTG GGGAAATCAT
3951 CGTCCTTTCC TTGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGCGGG
4001 ACGTCCTTCT GCTACGTCCC TTCGGCCCTC AATCCAGCGG ACCTTCCTTC
4051 CCGCGGCTG CTGCCGCTC TGCGGCCTCT TCCGCGCTT CGCCTCGCC
4101 CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCGG CCTCCCCGCA TCGAAACCCG
4151 CTGACTAGAC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC
4201 TCCCCCGTGC CTTCCCTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCTTTTC
4251 CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA
4301 TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC
4351 AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCCG CGGGCCGAG
4401 GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG CTCGCTCGGT
4451 CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTGCGCCG ACGCCCGGGC TTTGCCCGGG
4501 CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

```

SEQ ID NO: 62 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en AAV8.CYP4V2fv. AAV8.CYP4V2fv tiene el mismo promotor (CAG), potenciador (WPRE) y poliA (poliA-bGH) y secuencias de unión/enlazador que AAV5.CYP4V2st (SEQ ID NO: 61) y difiere solo en la secuencia de ADNc de CYP4V2:

ITR-Izquierda: 1-141
 Promotor CAG: 166-1880
 ADNc de CYP4V2fv: 1938-3515
 Potenciador WPRE: 3551-4139
 poliA de bGH: 4163-4387
 ITR-Derecha: 4399-4539

```

1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
51 CCGGGCGGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTCC TGCGGCCTAA
151 GGCAATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA
201 ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA
251 ACTTACGGTA AATGGCCCCG CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCCGCCCAT

```

ES 2 985 828 T3

```

301 TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC
351 CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTGGCAGT
401 ACATCAACTC TATCATATCC CAACTACGCC CCCTATTCAC CTC AATCACC
451 GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT
501 CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTCG
551 AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTCACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCCA
601 CCCCCAATTT TGTATTTATT TATTTTAA TTATTTGTG CAGCGATGGG
651 GCGGGGGGGG GGGGGGGCGC GCGCCAGGCG GGGCGGGGCG GGGCGAGGGG
701 CGGGGCGGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGGCG
751 GTCGCGAAAG TTTCCTTTTA TGGCGAGGCG GCGGCGGCGG CGGCCCTATA
801 AAAAGCGAAG CGCGCGGCGG GCGGGAGTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCCGT
851 GCCCCGCTCC GCGCGGCTC GCGCGGCCG CCCC GGCTCT GACTGACCGC
901 GTTACTCCCA CAGGTGAGCG GCGGGGACGG CCCTTCTCCT CCGGGCTGTA
951 ATTAGCGCTT GGTTTAATGA CGGCTCGTTT CTTTTCGTG GCTGCGTGAA
1001 AGCCTTAAAG GGCTCCGGGA GGGCCCTTTG TGCGGGGGGG AGCGGCTCGG
1051 GGGGTGCGTG CGTGTGTGTG TCGGTGGGGA GCGCCGCGTG CGGCCGCGC
1101 TGCCCGGCGG CTGTGAGCGC TGCGGGCGCG GCGCGGGGCT TTGTGCGCTC
1151 CCGTGTGCGC CGAGGGGAGC GCGGCCGGGG GCGGTGCCCC GCGGTGCGGG
1201 GGGGCTGCGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGGG
1251 TGAGCAGGGG GTGTGGGCGC GCGGTCGGG CTGTAACCCC CCCTGCACC
1301 CCCCTCCCCG AGTTGCTGAG CACGGCCCCG CTTGCGGTGC GGGGCTCCGT
1351 GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT CGCGTGCCG GCGGGGGGTT GGCGGCAGGT
1401 GGGGGTGCCG GCGGGGCGCG GCGCGCCTCG GCGCGGGGAG GGCTCGGGGG
1451 AGGGGCGCGG CGGCCCGGGA GCGCGGCGG CTGTGAGGC GCGGCGAGCG
1501 GACGCCATTG CTTTTATGG TAATCGTGCG AGAGGGCGCA GGGACTTCCT
1551 TTGTCCCAAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGGCGCGG CCGCACCCCC
1601 TCTAGCGGGC GCGGGCGAAG CGGTGCGGCG CCGGCAGGAA GGAAATGGGC
1651 GGGGAGGGCC TTCGTGCGTC GCGCGGCCCG CGTCCCCTTC TCCATCTCCA
1701 GCCTCGGGGC TGCCGCGAGG GGACGGCTGC CTTGCGGGGG GACGGGGCAG
1751 GCGGGGGTTC GGCTTCTGEC GTGTGACCGG CGGCTCTAGA GCTCTGCTA
1801 ACCATGTTCA TGCCTTCTTC TTTTCTCTAC AGCTCCTGGG CAACGTGCTG
1851 GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGGCAAA GAATTTCTAAT ACGACTCACT
1901 ATAGGGGAGC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACCATG GCGGGGCTCT
1951 GGCTGGGGCT CGTGTGGCAG AAGCTGCTGC TGTGGGGCGC GGGGAGTGCC
2001 CTTTCCCTGG CCGGCGCCAG TCTGGTCCTG AGCCTGCTGC AGAGGGTGCG
2051 GAGCTACGCG CGGAAATGGC AGCAGATGCG GCGCATCCCC ACGGTGGCCC
2101 GCGCCTACCC ACTGGTGGGC CACGCGCTGC TGATGAAGCC GGACGGGCGA
2151 GAATTTTTTC AGCAGATCAT TGAGTACACA GAGGAATACC GCCACATGCC
2201 GCTGCTGAAG CTCTGGGTCG GGCCAGTGCC CATGGTGGCC CTTTATAATG
2251 CAGAAAATGT GGAGTAATT TTAAGTAGTT CAAAGCAAAT TGACAAATCC
2301 TCTATGTACA AGTTTTTAGA ACCATGGCTT GGCCTAGGAC TTCTTACAAG
2351 TACTGGAAC AAATGGCGCT CCAGGAGAAA GATGTTAACA CCCACTTTCC
2401 ATTTTACCAT TCTGGAAGAT TTCTTAGATA TCATGAATGA ACAAGCAAAT
2451 ATATTGGTTA AGAACTTGA AAAACACATT AACCAAGAAG CATTTAACTG
2501 CTTTTTTTAC ATCACTCTTT GTGCCCTAGA TATCATCTGT GAAACAGCTA
2551 TGGGGAAGAA TATTGGTGCT CAAAGTAATG ATGATTCCGA GTATGTCCGT
2601 GCAGTTTATA GAATGAGTGA GATGATATTT CGAAGAATAA AGATGCCCTG
2651 GCTTTGGCTT GATCTCTGGT ACCTTATGTT TAAAGAAGGA TGGGAACACA
2701 AAAAGAGCCT TAAGATCCTA CATACTTTTA CCAACAGTGT CATCGCGGAA
2751 CGGGCCAATG AAATGAACGC CAATGAAGAC TGTAGAGGTG ATGGCAGGGG
2801 CTCTGCCCCC TCCAAAAATA AACGCAGGGC CTTTCTTGAC TTGCTTTTAA
2851 GTGTGACTGA TGACGAAGGG AACAGGCTAA GTCATGAAGA TATTCGAGAA
2901 GAAGTTGACA CCTTCATGTT TGAGGGGCAC GATACAACTG CAGCTGCAAT
2951 AACTGGTCC TTATACCTGT TGGGTTCTAA CCCAGAAGTC CAGAAAAAAG
3001 TGGATCATGA ATTGGATGAC GTGTTTGGGA AGTCTGACCG TCCCCTACA
3051 GTAGAAGACC TGAAGAAACT TCGGTATCTG GAATGTGTTA TTAAGGAGAC
3101 CCTTCGCTT TTTCTTCTG TTCCTTTATT TGCCCGTAGT GTTAGTGAAG
3151 ATTGTGAAGT GGCAGGTTAC AGAGTTCTAA AAGGCACTGA AGCGCTCATC
3201 ATTCCCTATG CATTGCACAG AGATCCGAGA TACTTCCCCA ACCCCGAGGA

```

ES 2 985 828 T3

```

3251 GTTCCAGCCT GAGCGGTTCT TCCCCGAGAA TGCACAAGGG CGCCATCCAT
3301 ATGCCTACGT GCCCTTCTCT GCTGGCCCCA GGAAGTGTAT AGGTCAAAAG
3351 TTTGCTGTGA TGGAAAGAAA GACCATTCTT TCGTGCAATC TGAGGCACTT
3401 TTGGATAGAA TCCAACCAGA AAAGAGAAGA GCTTGGTCTA GAAGGACAGT
3451 TGATTCTTCG TCCAAGTAAT GGCACTCTGA TCAAGTTGAA GAGGAGAAAT
3501 GCAGATGAAC GCTAAGCGGC CGCAACTCGA GACTCTAGAG GTTAATCGAT
3551 AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
3601 CTATGTTGCT CCTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCCTTGT
3651 ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTTGTATAAA
3701 TCCTGGTTGC TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG
3751 TGGCGTGGTG TGCCTGTGT TTGCTGACGC AACCCCACT GGTGGGGCA
3801 TTGCCACCAC CTGTGAGCTC CTTTCCGGGA CTTTCGCTTT CCCCCTCCCT
3851 ATTGCCACGG CGGAATCAT CGCCGCTGC CTTGCCCGCT GCTGGACAGG
3901 GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATTCCGT GGTGTTGTCG GGGAAATCAT
3951 CGTCCTTTCC TTGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGCGGG
4001 ACGTCCTTCT GCTACGTCCC TTCGGCCCTC AATCCAGCGG ACCTTCCTTC
4051 CCGCGGCTCG CTGCCGCTC TGCGGCTCT TCCGCGCTT CGCCTTCGCC
4101 CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCGG CCTCCCGCA TCGAAACCCG
4151 CTGACTAGAC GACTGTGCTT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTCGCCCC
4201 TCCCCCGTGC CTTCTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC
4251 CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTATTCTA
4301 TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC
4351 AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCCG CGGGCCGAG
4401 GAACCCCTAG TGATGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG CTCGCTCGCT
4451 CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGTTCGCCC ACGCCCGGGC TTTGCCCGGG
4501 CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

```

SEQ ID NO: 63 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en AAV5.CYP4V2op (nuevo). AAV5.CYP4V2op (nuevo) tiene el mismo promotor (CAG), potenciador (WPRE) y poliA (poliA-bGH) y las mismas secuencias de unión/enlazador que AAV5.CYP4V2st (SEQ ID NO: 61) y AAV8.CYP4V2fv (SEQ ID NO: 62), pero secuencias de ADNc de CYP4V2 diferentes:

ITR-Izquierda: 1-141
 Promotor CAG: 166-1880
 ADNc de CYP4V2op: 1938-3515
 Potenciador WPRE: 3551-4139
 poliA de bGH: 4163-4387
 ITR-Derecha: 4399-4539

```

CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCG GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTC TGCGGCCTAA
GGCAATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA
ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTC GCGTTACATA
ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCGCAACGAC CCGCGCCCAT
TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC
CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTGGCAGT
ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACG
GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT
CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTCTG
AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTTACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCCA
CCCCCAATTT TGTATTTATT TATTTTTTAA TTATTTTGTG CAGCGATGGG
GGCGGGGGGG GGGGGGGCGC GCGCCAGGCG GGGCGGGGCG GGGCGAGGGG
CGGGGGCGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGCGC
GCTCCGAAAG TTTCCTTTTA TGGCGAGGCG GCGGCGGCGG CGGCCCTATA
AAAAGCGAAG CGCGCGGCGG GCGGGAGTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCCGT
GCCCCGCTCC GCGCCGCTC GCGCCGCCC CCGCGGCTCT GACTGACCGC
GTTACTCCCA CAGGTGAGCG GCGGGGACGG CCCTTCTCCT CCGGGCTGTA
ATTAGCGCTT GGTTAATGA CGGCTCGTTT CTTTTCTGTG GCTGCGTGAA

```

AGCCTTAAAG GGCTCCGGGA GGGCCCTTTG TCGGGGGGGG AGCGGCTCGG
 GGGGTGCGTG CGTGTGTGTG TCGGTGGGGA GCGCCGCGTG CGGCCCGCGC
 TGCCCGGCGG CTGTGAGCGC TCGGGGCGCG GCGCGGGGCT TTGTGCGCTC
 CGCGTGTGCG CGAGGGGAGC GCGGCCGGGG GCGGTGCCCC GCGGTGCGGG
 GGGGCTGCGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGGG
 TGAGCAGGGG GTGTGGGCGC GCGGTGCGGG CTGTAACCCC CCCCTGCACC
 CCCCTCCCCG AGTTGCTGAG CACGGCCCGG CTTCGGGTGC GGGGCTCCGT
 GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT GCGCGTGCCG GCGGGGGGGT GCGGCGAGGT
 GGGGGTGCCG GCGGGGGCGG GGCCGCGCTC GCGCGGGGAG GGCTCGGGGG
 AGGGGCGCGG CGGCCCGGGA GCGCGGGCGG CTGTGAGGC GCGGCGAGCC
 GCAGCCATTG CCTTTTATGG TAATCGTGCG AGAGGGCGCA GGGACTTCCT
 TTGTCCCAAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGGGCGCG CCGCACCCCC
 TCTAGCGGGC GCGGGCGAAG CGGTGCGGCG CCGGCAAGAA GGAAATGGGC
 GGGGAGGGCC TTCGTGCGTC GCGCGCGCGC CGTCCCCTTC TCCATCTCCA
 GCGTCGGGGC TGCCGAGGG GGACGGCTGC CTTCGGGGGG GACGGGGCAG
 GCGGGGGTTC GGCTTCTGGC GTGTGACCGG CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA
 ACCATGTTCA TGCCTTCTTC TTTTCTCTAC AGCTCCTGGG CAACGTGCTG
 GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGGCAAA GAATCTAAT ACGACTCACT
 ATAGGGAGAC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACC
 ATGGCTGGACTGTGGCTGGGACTGGTGTGGCAGAAACTGCTGCTGTGGGGGCGCGCTTCGCCACTGTCACTGGCTGG
 GGCTTCACTGGTGTGCTGAGCCTGTGCGAGAGGTGGCCTCCTACGCCAGAAAGTGGCAGCAGATGAGGGCCATCCCTA
 CCGTGGCCAGAGCCTATCCACTGGTGGGACACGCACTGCTGATGAAGCCTGACGGCAGAGAGTTCTTTACGAGATC
 ATCGAGTACACAGAGGAGTATAGGCACATGCCACTGCTGAAGCTGTGGGTGGGACCCGTCCTATGGTGGCCCTGTA
 CAACGCCGAGAATGTGGAAGTGATCCTGACCAGCAGCAAGCAGATCGATAAGTCTAGCATGTATAAGTTCTTGGAGC
 CTTGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGTGACCTCTACAGGCAACAAAGTGGAGGAGCCGAGAGAAAGATGCTGACCCCAACATTC
 CACTTTACAATCCTGGAGGACTTCTGACATCATGAACGAGCAGGCCAATATCCTGGTGAAGAAGCTGGAGAAGCA
 CATCAACCAGGAGGCCCTTAATTGCTTCTTTTACATCACCTGTGCGCCCTGGACATCATCTGTGAGACAGCTATGG
 GCAAGAACATCGCGCGCCAGTCTAATGACGATAGCGAGTACGTGCGGGCCGTGTATAGAATGAGCGAGATGATCTTT
 AGGCGCATCAAGATGCCCTGGCTGTGGCTGGATCTGTGGTATCTGATGTTCAAGGAGGGCTGGGAGCACAAGAAGTC
 CCTGCAGATCCTGCACACCTTTACAAACTCTGTGATCGCCGAGAGAGCCAAATGAGATGAACGCCAATGAGGACTGTA
 GGGGCGATGGAAGGGGCGAGCGCCCTTCCAAGAACAAGCGGAGAGCCTTCTTGGACCTGTGCTGAGCGTGACCGAC
 GATGAGGGCAATCGCCTGTCCCACGAGGACATCCGGGAGGAGGTGGATACATTGTTTGGGGACACGACACCAC
 AGCCGCGCCCATCAACTGGTCCCTGTACCTGCTGGGCTCTAATCCAGAGGTGCAGAAGAAGTGGATCACGAGCTGG
 ACGAGCTGTTTCGGCAAGTCCGACAGGCCAGCAACCGTGGAGGATCTGAAGAAGCTGAGATACCTGGAGTGCGTGATC
 AAGGAGACACTGCGCCTGTTCCTCTGTGCTCTGTTTGGCCGGTCCGTGTCTGAGGACTGTGAGGTGGCCGGCTA
 TCCGCTGCTGAAGGGCACCGAGGCGCTGATCATCCCTTACGCCCTGCACCGGGACCCAGGTATTTCCCTAACCAG
 AGGAGTTTTCAGCCAGAGAGATTCTTTCCGAGAATGCCAGGGCAGGCACCTTACGCCCTATGTCCATTCTCCGCC
 GGACCAAGGAAGTGCATCGGACAGAAGTTTCCGCTGATGGAGGAGAAAACCATCCTGTCTGTATCCTGAGACACTT
 CTGGATCGAGAGCAATCAGAAGAGGGAGGAGCTGGGCTGGAGGACAGCTGATCCTGCGGCCAAGCAACGGCATCT
 GGATCAAACTGAAAAGAGGAACGCTGACGAGAGGTAAAGCGG CGCAACTCGA GACTCTAGAG GTTAATCGAT
 AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
 CTATGTTGCT CCTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCTTTGT
 ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTGTATATAA
 TCCTGGTTGC TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG
 TGGCGTGGTG TGCCTGTGT TTGCTGACGC AACCCTCACT GGTGGGGCA
 TTGCCACCAC CTGTGAGCTC CTTTCCGGGA CTTTCGCTTT CCCCCTCCCT
 ATTGCCACGG CGGAATCAT CGCCGCGTGC CTTGCCCGCT GCTGGACAGG
 GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATTCCGT GGTGTTGTGCG GGGAAATCAT
 CGTCCTTTCC TTGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGCGGG
 ACGTCTTTCT GCTACGTCCT TCGGCCCTC AATCCAGCGG ACCTTCCTTC
 CCGCGGCCCT TCGCGGCTC TCGGCTCTT TCCGCTCTT CGCCTTCGCC
 CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCCG CTTCCCGCA TCGAAACCCG
 CTGACTAGAC GACTGTGCTT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTCGCC
 TCCCCCGTGC CTTCTTTGAC CTTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC
 CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA
 TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC
 AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCCG CGGGCCGCG
 GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG CTGCTCGCT
 CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGTTCGCCCC ACGCCCGGGC TTTGCCCGGG

CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

5 SEQ ID NO: 64 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en scAAV1.CYP4V2op, scAAV5.CYP4V2op y scAAV9.CYP4V2op.

ITR-Izquierda (truncada): 1-117
 Promotor EFS: 130-364
 ADNc de CYP4V2op: 520-2097
 SPA: 2116-2169
 ITR-Derecha: 2263-2403

10

```

1 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgcctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc
61 gggcgacctt tggctgcccc gctcagtgta ggcagcgagc gcgcagagag ggagtggaag
121 cgtaggcctg attggctccg gtgcccgtca gtgggcagag cgcacatcgc ccacagtccc
181 cgagaagttg gggggagggg tcggcaattg aaccgggtgc tagagaaggt ggcgcggggt
241 aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt cccgaggggt ggggagaacc
301 gtatataagt gcagtagtcg ccgtgaacgt tctttttcgc aacggggttg ccgccagaac
361 acaggtgtcg tgacgcgacc aggtatgcat ctgcagctct aaggtaaata taaaattttt
421 aagtgtataa tgtgttaaac tactgattct aattgtttct ctcttttaga ttccaacctt
481 tggaaactgac tgcagggatc caagctttct agagccacca tggctggact gtggctggga
541 ctggtgtggc agaaactgct gctgtggggg gccgcttccg cactgtcact ggctggggct
601 tcaactgtgc tgagcctgct gcagaggggt gccctcctacg ccagaaagtg gcagcagatg
661 agggccatcc ctaccgtggc cagagccctat ccactgtgtg gacacgcact gctgatgaag
721 cctgacggca gagagtctct tcagcagatc atcgagtaca cagaggagta taggcacatg
781 ccactgctga agctgtgggt gggaccctgt cctatgtgtg cctgtacaa cgccgagaat
841 gtggaagtga tcctgaccag cagcaagcag atcgataagt ctacgatgta taagttcctg
901 gagccttggc tgggcctggg cctgctgacc tctacaggca acaagtggag gagccggaga
961 aagatgctga cccaacatt ccactttaca atcctggagg acttctctga catcatgaac
1021 gagcaggcca atatcctggt gaagaagctg gagaagcaca tcaaccagga ggcctttaat
1081 tgcttctttt acatcacctt gtgcgccttg gacatcatct gtgagacagc tatgggcaag
1141 aacactggcg ccagtcctaa tgacgatagc gactacgtgc gggcctgtga tagaatgagc
1201 gagatgatct ttaggcgcat caagatgccc tggctgtggc tggatctgtg gtatctgatg
1261 ttcaaggagg gctgggagca caagaagtcc ctgcagatcc tgcacacctt taaaaactct
1321 gtgatcgccg agagagccaa tgagatgaac gccaatgagg actgtagggt cgatggaagg
1381 ggcagcgccc ctccaagaa caagcggaga gccctcctgg acctgctgct gagcgtgacc
1441 gacgatgagg gcaatcgctt gtcccacgag gacatccggg aggaggtgga tacattcatg
1501 tttgagggac acgacaccac agccgcgcct atcaactggt cctgtacctg ctgggctctg
1561 aatccagagg tgcagaagaa ggtggatcac gagctggacg acgtgttcgg caagtcggac
1621 aggcagcaa ccgtggagga tctgaagaag ctgagatacc tggagtgcgt gatcaaggag
1681 aactgcgcc tgttccccct tgtgcctctg tttgcccggt ccgtgtctga ggactgtgag
1741 gtggccggct atcgctgct gaagggcacc gaggcctgta tcatccctta cgccctgcac
1801 cgggacccca ggtatttccc taaccagag gagtttcagc cagagagatt cttcccgag
1861 aatgccagg gcaggcaccc ttacgcctat gtgccattct ccgccggacc aaggaaactgc
1921 atcggacaga agtttgccgt gatggaggag aaaaccatcc tgtcttgat cctgagacac
1981 ttctggatcg agagcaatca gaagagggtg gagctgggcc tggagggaca gctgatcctg
2041 cggccaagca acggcatctg gatcaaacctg aaaagaagga acgctgacga gaggtaaaag
2101 cttgaattcc tcgaggatcc aataaaagat ctttattttc attagatctg tgtgttggtg
2161 ttttgtgtgt ctagtgtcca gccatctgtt gtttgccct ccccggtgcc ttccttgacc
2221 ctggaaggtg ccactcccag tttaaactta attaagggcc gcaggaaacc ctagtgtggt
2281 agttggccac tccctctctg cgcgctcgtc cgctcactga ggccgggcga ccaaaggctg
2341 cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgccg agctgcctgc
2401 agg

```

5 Para evaluar la diferencia en la eficacia entre los ADNc de CYP4V2st y CYP4V2op en la terapia génica con CYP4V2, se comparan dos vectores de AAV5 con el mismo promotor (CAG), potenciador (WPRE) y poli A (poliA-bGH) y las mismas secuencias de unión/enlazador, uno que porta el ADNc de CYP4V2st (AAV5.CYP4V2st (SEQ ID NO: 61)) y el otro que porta el ADNc de CYP4V2op (AAV5.CYP4V2op (nuevo) (SEQ ID NO: 63)) en cuanto a su eficacia para rescatar la atrofia del RPE en iPS-RPE derivada de paciente con BCD usando el ensayo de viabilidad celular descrito en el presente documento.

10 Para evaluar si diferentes secuencias de unión/enlazador utilizadas en la SEQ ID NO: 60 y la SEQ ID NO: 63 afectan a la expresión del ADNc de CYP4V2 o del casete de expresión, se comparan dos vectores de AAV5 (AAV5.CYP4V2op (SEQ ID NO: 60) y AAV5.CYP4V2op (nuevo) (SEQ ID NO: 63)) con el mismo promotor (CAG), potenciador (WPRE) y poliA (poliA-bGH) y el mismo ADNc de CYP4V2 (CYP4V2op (SEQ ID NO: 2)), pero
15 diferentes secuencias de unión/enlazador, en cuanto a su eficacia en el rescate de la atrofia del RPE en iPS-RPE derivada de paciente con BCD usando un ensayo de viabilidad celular descrito en el presente documento.

20 Debe entenderse que pueden usarse diferentes ADNc de CYP4V2 (SEQ ID NO: 1, 2, 3 u otras) en cualquier casete de expresión de CYP4V2 descrito en el presente documento en lugar del ADNc de CYP4V2 contenido en las secuencias del casete de expresión proporcionadas en el presente documento para su uso en terapia génica con CYP4V2. También debe entenderse que cada casete de expresión de CYP4V2 descrito en el presente documento puede empaquetarse en vectores de rAAV de diversos serotipos/cápsides para su uso en terapia génica con CYP4V2, incluyendo aquellos diferentes de los utilizados en este estudio (por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV2(Y444F+Y500F+Y730F), AAV5, AAV8 y AAV9). Asimismo, el casete de expresión de CYP4V2 empaquetado
25 en vectores de scAAV utilizados en este estudio también puede empaquetarse en vectores de ssAAV para su uso en terapia génica con CYP4V2, después de cambiar la ITR de AAV mutante utilizada en la construcción de scAAV por la ITR de AAV no mutante utilizada en la construcción de ssAAV. Por otro lado, los ADNc de CYP4V2 o los casetes de expresión (con o sin las ITR de AAV) descritos en el presente documento pueden empaquetarse en

otros vectores víricos (es decir, vectores no de AAV, tales como retrovirus, lentivirus, adenovirus y virus del herpes simple u otros vectores víricos) o vectores no víricos (por ejemplo, plásmidos, nanopartículas o nanopartículas a base de lípidos (por ejemplo, complejo liposoma-protamina-ADN (LPD)) para su uso en la terapia génica con CYP4V2.

Ejemplo 12 - Tratamiento de células iPS-RPE derivadas de pacientes con BCD mediante AAV.CYP4V2

Se infectaron células iPS-RPE derivadas de pacientes con BCD con diversos vectores de AAV.CYP4V2 descritos anteriormente en medio RPE sin suero. Después de 1 día, el medio que contenía virus se reemplazó con medio RPE nuevo que contenía suero para continuar con el cultivo de RPE. Para evaluar los efectos terapéuticos de diferentes dosificaciones, se sometió a ensayo diferente multiplicidad de infección (MOI, copias genómicas (GC)/célula).

Ejemplo 13 - Ensayos para evaluar el efecto de la terapia génica con AAV.CYP4V2

Después de la infección con AAV.CYP4V2, las células iPS-RPE de pacientes con BCD se cultivaron en medio RPE durante al menos 4 días para scAAV o al menos 10 días para ssAAV antes de que las células se recogiesen para realizar ensayos. Los protocolos de recogida de células y los protocolos de preparación de muestras se siguieron como se describió anteriormente.

Los ensayos bioquímicos descritos en los Ejemplos del presente documento para detectar ácidos grasos, ceramidas (Cer), esfingomielinas (SM) y esfingosina y esfinganina (SOSA), se realizaron en células iPS-RPE de pacientes con BCD tratadas con AAV.CYP4V2 y se siguió el mismo protocolo de ensayos bioquímicos usando CL-EM. La Tabla 3 anterior muestra los resultados en células iPS-RPE de control sanas, células iPS-RPE de pacientes con BCD sin tratamiento con AAV.CYP4V2 y después del tratamiento con AAV.CYP4V2.

Los resultados demostraron que el fenotipo en las células iPS-RPE de pacientes con BCD (por ejemplo, niveles anormales de ácidos grasos (por ejemplo, DHA, AA y total de ácidos grasos n3) en comparación con el control) mejoró o se corrigió mediante la terapia génica con AAV.CYP4V2. Esto estableció la eficacia de la terapia génica con AAV.CYP4V2 en estirpes celulares de iPS-RPE derivadas de pacientes con BCD. Debido a que la BCD es causada principalmente por la degeneración del RPE, la eficacia de la terapia génica con AAV.CYP4V2 en estirpes celulares de iPS-RPE específicas de paciente con BCD estableció la eficacia de la terapia génica con AAV.CYP4V2 para pacientes con BCD.

De manera significativa, el tratamiento con scAAV.CYP4V2op logró la mejora más significativa en muy poco tiempo (solo 4 días después del tratamiento). Esto demostró que el scAAV actúa rápidamente porque no requiere que la maquinaria celular sintetice una cadena de ADN complementaria. Por la misma razón, se espera que un período de tiempo más prolongado entre el tratamiento con AAV.CYP4V2 y la recogida de células para los ensayos pueda generar mejoras más significativas en los resultados, particularmente para la terapia génica con CYP4V2 empaquetada en vectores de ssAAV.

Los resultados rápidos y sólidos logrados por el vector scAAV en células RPE humanas establecieron que los vectores de dsAAV pueden ser particularmente útiles para rescatar enfermedades de aparición temprana y/o pacientes humanos en fase tardía con RPE o degeneraciones retinianas. Además, el sólido perfil de expresión de los vectores de scAAV los hace también adecuados para la administración intravítrea para su suministro a la retina.

Rescate de la atrofia del RPE por AAV.CYP4V2

Se expusieron muestras de iPS-RPE obtenidas de pacientes con BCD a luz azul durante 1 hora, después se realizó el ensayo de viabilidad celular en las muestras al día siguiente como se describió anteriormente en el presente documento.

En las Figuras del presente documento se muestran imágenes de viabilidad celular que comparan muestras de iPS-RPE de pacientes sin tratamiento con AAV.CYP4V2 frente a con tratamiento.

Cada uno de los tratamientos con AAV2.CYP4V2op y scAAV.CYP4V2op mostró rescate de la atrofia del RPE en muestras de iPS-RPE derivadas de pacientes con BCD en comparación con muestras de pacientes no tratados (Figura 8. MOI = 1×10^5 GC/célula). Curiosamente, la eficacia de rescate de AAV2.CYP4V2op y scAAV.CYP4V2op a una MOI de 1×10^5 es mayor en iPS-RPE de P2 que en iPS-RPE de P1. Esto sugiere que la dosis óptima para el uso de la terapia génica con AAV.CYP4V2 para tratar la BCD puede variar basándose en las diferencias individuales entre los pacientes y que la iPS-RPE específica de paciente con BCD es una herramienta útil para evaluar la dosis óptima personalizada para diferentes pacientes.

Cada uno de los tratamientos con AAV5.CYP4V2op, AAV5.CYP4V2st y AAV8.CYP4V2fv rescató la atrofia del RPE en una muestra de iPS-RPE derivadas de pacientes con BCD en comparación con una muestra de pacientes no tratados (Figura 9. MOI = 1×10^5).

Cada uno de los tratamientos con AAV5.CYP4V2op, scAAV1.CYP4V2op y scAAV5.CYP4V2op rescató la atrofia del RPE en una muestra de iPS-RPE derivadas de pacientes con BCD en comparación con una muestra de pacientes no tratados (Figura 10. MOI = 1×10^4).

El tratamiento con scAAV9.CYP4V2op rescató la atrofia del RPE en una muestra de iPS-RPE derivadas de pacientes con BCD en comparación con una muestra de pacientes no tratados (Figura 11. MOI = 1×10^5 . 2 semanas después del tratamiento).

De manera significativa, el tratamiento con AAV.CYP4V2 a una dosis más baja (MOI = 1×10^4) en muestras de P2 logró resultados similares o mejores que una dosis más alta (MOI = 1×10^5 GC/célula) de tratamiento con el mismo vector en muestras de P1. Esto demostró a nivel celular que para lograr la misma o similar eficacia en el rescate de la atrofia del RPE, diferentes pacientes pueden necesitar diferentes dosificaciones. En otras palabras, un vector y un nivel de dosis similar para todos los pacientes de la misma enfermedad puede no ser el enfoque más eficiente desde el punto de vista médico o económico para la terapia génica. El modelo celular de BCD y modelos celulares similares para otras enfermedades oculares pueden proporcionar orientación sobre la dosis óptima personalizada.

También se someten a ensayo otros vectores de AAV.CYP4V2 y muestran una atrofia del RPE mejorada en una muestra de iPS-RPE de pacientes con BCD, incluyendo el tratamiento con AAV2tri(Y-F).CYP4V2op (MOI de 1×10^4) y AAV5.CYP4V2op (nuevo) (SEQ ID NO: 63) a diferentes niveles de MOI (1×10^4 y 1×10^5 GC/célula). Adicionalmente, ImageJ (Fiji) procesó las imágenes de viabilidad celular para contar el número de células vivas y muertas en las muestras de iPS-RPE. Se usaron cuatro áreas/imágenes diferentes de cada muestra para contar y se promediaron las relaciones de células vivas/muertas de múltiples imágenes de la misma muestra. Las relaciones de células vivas/muertas demostraron que el tratamiento con AAV.CYP4V2 rescató la atrofia de las células RPE en iPS-RPE derivadas de pacientes con BCD. Por ejemplo, la relación de células vivas/muertas de TS2 es del 3,0 %, P1 (sin tratamiento con AAV.CYP4V2) es del 20,87 % y P1 tratado con AAV5.CYP4V2st es del 9,69 %. El tratamiento con otros vectores de AAV.CYP4V2 también redujo la relación de células vivas/muertas en muestras de iPS-RPE de pacientes con BCD.

Estos resultados demostraron que:

- (1) diversos vectores de AAV.CYP4V2, casetes de expresión y ADNc de CYP4V2 rescataron la atrofia del RPE en BCD;
- (2) El vector de AAV autocomplementario (scAAV) logra rápidamente la eficacia de rescate;
- (3) Se puede lograr eficacia con diferentes niveles de dosificación.

Ejemplo 14 - Seguridad de los vectores de AAV.CYP4V2 y fabricación GMP para su uso clínico

Estudios anteriores demostraron que CYP4V2 se expresa casi ubicuamente en órganos humanos y el nivel de expresión dentro del ojo es alto la retina. Asimismo, la seguridad de los vectores de AAV se ha establecido en estudios de terapia génica y ensayos clínicos para otras enfermedades. Por lo tanto, es razonable esperar que los vectores de AAV.CYP4V2 sean seguros de usar en terapia génica.

En este estudio, se usaron diversos vectores de AAV.CYP4V2 para tratar muestras de iPS-RPE humanas a una dosis alta (por ejemplo, MOI 1×10^5). No se observó ninguna diferencia importante en la muerte celular entre las muestras no tratadas y las tratadas con AAV.CYP4V2, excepto por que AAV.CYP4V2 rescató la atrofia del RPE en muestras de iPS-RPE derivadas de pacientes con BCD como se describe en el Ejemplo anterior. Esto estableció la seguridad de los vectores de AAV.CYP4V2 y demuestra que se pueden lograr niveles altos de expresión del gen codificante de CYP4V2 transducido sin evidencia significativa de toxicidad.

Además de realizar ensayos en estirpes celulares, la seguridad de la terapia génica con AAV.CYP4V2 también se puede someter a ensayo en animales, por ejemplo, en ratones, ratas o primates no humanos, y/o mediante ensayos clínicos en seres humanos. Hay disponibles diversos métodos y plataformas de fabricación para producir vectores de AAV recombinantes para su uso clínico humano. Por ejemplo, y sin limitación, la fabricación GMP de vectores de rAAV puede usar un método de transfección de 2 plásmidos o un método de transfección de 3 plásmidos, puede usar estirpes celulares de mamíferos tales como HEK293, A459 o 293T, o estirpes celulares de insecto tales como la plataforma celular baculovirus/Sf9, puede usar cultivo celular adherente o en suspensión. Además, pueden usarse diversos métodos, procesos y/o plataformas, incluyendo, sin limitación, el sistema de producción basado en el virus del herpes simple (HSV), biorreactores de un solo uso (por ejemplo, iCELLis), HYPERStacks, frascos rodantes y cromatografía en columna, para aumentar el rendimiento o el título, o mejorar la pureza, y/o evitar una posible contaminación. Estos métodos, procesos, técnicas y plataformas de producción clínica de vectores de rAAV, se conocen en la técnica y están disponibles en el mercado a través de organizaciones de fabricación por contrato (CMO) o instalaciones académicas de GMP, por ejemplo, Lonza (EE.UU.), Cobra Biologics (Reino Unido), Nationwide Children's Hospital (NCH. Ohio, EE.UU.), Children's Hospital of Philadelphia (CHOP. EE.UU.), WuXi Biologics (China y EE.UU.). Los vectores de AAV.CYP4V2 para su uso clínico humano se pueden fabricar usando

uno cualquiera o más de los métodos, procesos, técnicas, plataformas e instalaciones de GMP mencionados en el presente documento y/u otros conocidos en la técnica o que se desarrollen en el futuro.

Ejemplo 15 - Selección de sujetos y administración de AAV.CYP4V2 *in vivo* para tratar la BCD

Un criterio de elegibilidad de sujetos de ejemplo para el ensayo clínico en seres humanos de AAV.CYP4V2 se enumera a continuación:

Criterios de inclusión

Los sujetos son elegibles para participar en el estudio si cumplen con todos los siguientes criterios de inclusión.

1. Están dispuestos y son capaces de dar su consentimiento informado para participar en el estudio.
2. ≥ 18 años de edad.
3. Tienen un diagnóstico genéticamente confirmado de mutación de CYP4V2 bialélica.
4. Tienen una enfermedad activa clínicamente visible dentro de la región macular en el ojo de estudio.
5. Tienen una agudeza visual corregida mejor (BCVA) de 34-73 letras ETDRS (equivalente a peor o igual a una agudeza de Snellen 20/40, pero mejor o igual a una agudeza de Snellen 20/200) en el ojo de estudio.

Criterios de exclusión

Los sujetos no son elegibles para participar en el estudio si cumplen con alguno de los siguientes criterios de exclusión.

1. Tienen antecedentes de ambliopía en el ojo elegible.
2. No están dispuestos a usar métodos anticonceptivos de barrera, durante un período de 3 meses, si son tratados con AAV.
3. Cirugía intraocular previa realizada en el ojo de estudio en los 3 meses anteriores a la primera visita.
4. Tienen cualquier otra enfermedad/trastorno ocular o no ocular importante que, en opinión del investigador, pueda poner en riesgo a los sujetos debido a la participación en el estudio, o pueda influir en los resultados del estudio, o en la capacidad del sujeto para participar en el estudio. Esto incluye, pero sin limitación, un sujeto:
 - con una contraindicación para los corticoesteroides orales (por ejemplo, prednisolona/prednisona)
 - con una catarata clínicamente significativa
 - quien, en la opinión clínica del investigador del estudio, no es un candidato apropiado para el procedimiento quirúrgico (por ejemplo, cirugía subretiniana).

5. Han participado en otro estudio de investigación que implica un producto en investigación en las últimas 12 semanas o recibieron una terapia basada en genes/células en cualquier momento anterior.

Para el uso de AAV.CYP4V2 para tratar la BCD, el paciente debe tener un diagnóstico genético o molecular confirmado de BCD, es decir, confirmación de la mutación de CYP4V2 bialélica mediante ensayos genéticos (ensayo de un solo gen o ensayo de panel de múltiples genes si es médicamente necesario). Debido a que la BCD en ocasiones se diagnostica como un trastorno retiniano hereditario (IRD, por sus siglas en inglés), degeneración retiniana (RD, por sus siglas en inglés) o retinitis pigmentosa (RP), también puede usarse AAV.CYP4V2 para tratar a un paciente con IRD, RD o RP con mutación de CYP4V2 bialélica confirmada genéticamente.

Para el tratamiento con AAV.CYP4V2 *in vivo*, el paciente debe tener células retinianas viables como se determina mediante tomografía de coherencia óptica (OCT, por sus siglas en inglés) y/u oftalmoscopia. Preferentemente, al paciente le debe quedar algo de visión (por ejemplo, agudeza visual corregida mejor (AVCM) mejor o igual a 20/200 (0,1 decimal en el ojo que se ha de tratar).

Pueden usarse diversos medios/vías de suministro para suministrar vectores de AAV.CYP4V2 a las células diana (por ejemplo, células retinianas o de la córnea) *in vivo*, incluyendo, sin limitación, la administración a la retina puede realizarse mediante inyección subretiniana, inyección intravítrea (usando vectores de AAV adecuados para el suministro intravítreo, por ejemplo, AAV2(Y444F+Y500+Y730F), AAV 7m8 o sus derivados) o suministro a través del torrente sanguíneo (usando vectores de AAV que pueden atravesar la barrera hematorretiniana, por ejemplo, AAV9 o AAV-PHP.B). Asimismo, los vectores de AAV.CYP4V2 también pueden encapsularse en un dispositivo para implantarse por vía intravítrea como forma de administración.

Se conocen en la técnica métodos quirúrgicos/de administración relacionados con la terapia génica, así como determinadas técnicas para mejorar la eficiencia del suministro/transducción (por ejemplo, pelado de la membrana limitante interna (ILM) y vitrectomía (VIT)). Pueden usarse inmunodepresores, por ejemplo, corticoesteroides antes, durante y/o después de la administración de AAV para minimizar las respuestas inmunitarias.

Además de tratar a los pacientes *in vivo*, la terapia génica con CYP4V2 (incluyendo la terapia génica con AAV.CYP4V2) puede usarse para tratar las células diana (por ejemplo, células RPE derivadas de IPS de pacientes

con BCD, células retinianas, células del epitelio corneal o células corneales) *in vitro* y después trasplantar dichas células al paciente como terapia celular. En los Ejemplos y la divulgación del presente documento se proporcionan métodos de uso de vectores de AAV.CYP4V2 para tratar células iPS-RPE de pacientes con BCD. Se conocen en la técnica métodos de implantación/trasplante de células, por ejemplo, a la retina y la córnea. Por ejemplo, pueden usarse métodos y técnicas quirúrgicas iguales o similares para trasplantar células ES-RPE a la retina para trasplantar células iPS-RPE de pacientes con BCD.

Las dosis terapéuticamente eficaces pueden determinarse y evaluarse en modelos de enfermedad (por ejemplo, modelo celular de BCD (por ejemplo, estirpe celular iPS-RPE derivada de pacientes con BCD) o un modelo animal, y confirmarse o refinarse mediante ensayos clínicos. Para el tratamiento de células *in vitro*, la dosis por lo general se expresa como MOI y después se multiplica la MOI por el número de células que se están tratando. La MOI generalmente varía entre aproximadamente 1×10^3 GC y aproximadamente 1×10^6 GC por célula o una MOI infecciosa de aproximadamente 100 a aproximadamente 10.000 GC por célula (GC: copias genómicas, que miden partículas de AAV que contienen genoma (también conocidas como genoma de vector (vg) o partículas de genoma (gp)). Para el tratamiento *in vivo*, se deben considerar factores clínicos típicos para determinar la dosis, tales como la vía de administración, el tamaño del área o el número de células diana y el sujeto que se está tratando (por ejemplo, la edad, el peso, la fase de desarrollo de la enfermedad y el estado del sujeto que se ha de tratar, y posibles reacciones inmunitarias); la ubicación de las células diana del tratamiento (por ejemplo, retina frente a córnea). Asimismo, también se debe considerar la eficiencia de transducción y la eficiencia de rescate del vector de AAV.CYP4V2 que se está usando. Por último, si es posible, también se deben considerar las diferencias individuales en la dosis óptima a nivel celular entre pacientes, que pueden evaluarse en las células iPS-RPE específicas de paciente. Por lo tanto, la dosis terapéuticamente eficaz para una única administración local en el ojo *in vivo* puede ser del orden de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 2×10^{13} GC, inclusive (por ejemplo, un intervalo de dosis alta de aproximadamente 1×10^{11} GC a aproximadamente 1×10^{12} GC, un intervalo de dosis media de aproximadamente 1×10^{10} GC a aproximadamente 1×10^{11} GC, un intervalo de dosis baja de aproximadamente 1×10^9 GC a aproximadamente 1×10^{10} GC, un intervalo de dosis muy baja de aproximadamente 1×10^6 GC a aproximadamente 1×10^9 GC, y un intervalo de dosis muy alta de aproximadamente 1×10^{12} GC a aproximadamente 2×10^{13} GC), o cualquier dosis dentro estos intervalos que es suficiente para proporcionar el efecto deseado. La composición se administra a una dosis de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 2×10^{13} GC. La dosis administrada *in vivo* se puede determinar multiplicando el número de células diana del tratamiento por la MOI diana (por ejemplo, de aproximadamente 1×10^3 GC a aproximadamente 1×10^6 GC por célula). El volumen del agente que contiene los vectores de rAAV en cualquier administración local única al ojo puede variar de aproximadamente 1 μ l (0,001 ml) a aproximadamente 1000 μ l (1 ml). El tratamiento mediante suministro a través del torrente sanguíneo requiere una dosis mucho más alta y puede estar en el intervalo de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 2×10^{14} GC por kg de peso corporal.

Véase "E. Opciones de tratamiento, selección de sujetos y administración" y otra divulgación del presente documento para obtener más descripción.

Ejemplo 16 - Evaluación después del tratamiento

Puesto que los síntomas clínicos de la BCD son similares a los de muchos otros tipos de IRD, RD y RP, por ejemplo, pérdida de agudeza visual, campos visuales restringidos, ceguera nocturna, adaptación reducida a la oscuridad, sensibilidad al contraste y visión del color, cambios en la retina (y en la córnea para algunos pacientes) y respuestas disminuidas en el electroretinograma (ERG), pueden usarse medidas relacionadas para evaluar el estado de la enfermedad de un paciente con BCD y su progresión antes y después del tratamiento, evaluando de este modo el resultado del tratamiento. Estas medidas y los exámenes y ensayos relacionados se conocen en la técnica para enfermedades de la retina y la córnea. Por ejemplo, y sin limitación, la mejor agudeza visual corregida mejor (usando una tabla de agudeza visual) puede usarse como medida de resultado primaria para la terapia génica de BCD, con uno o más de los siguientes como medidas de resultado secundarias: microperimetría (cambio de sensibilidad), autofluorescencia del fondo de ojo (AF) (cambio en la FA), tomografía de coherencia óptica (OCT) (zona elipsoide y espesor de la retina), sensibilidad al contraste (gráfico de Pelli-Robson), visión del color (ensayo de 100 tonos de Farnsworth-Munsell) y ERG (cambios en ERG). Asimismo, también pueden usarse ensayos funcionales, tales como la prueba de movilidad, como medida del resultado primaria o secundaria. Las evaluaciones pueden realizarse en diferentes puntos temporales posteriores al tratamiento, por ejemplo, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 6 meses y 12 meses. Los resultados pueden usarse para evaluar el resultado del tratamiento. La eficacia se puede demostrar como uno de los siguientes: mejora en una o más de las medidas de resultado primarias o secundarias, parada de la progresión de la enfermedad o velocidad de degeneración de la retina o pérdida de visión más lenta de lo esperado (usando datos de un estudio de historia natural si es necesario).

Ejemplo 17: Método para reducir las respuestas inmunitarias y abordar las diferencias individuales en la terapia génica

La terapia génica mediada por vectores víricos puede desencadenar respuestas inmunitarias celulares, locales o

sistémicas, que puedan suponer riesgos para la seguridad. Las reacciones inmunitarias también pueden disminuir la eficiencia de la transducción y, por lo tanto, disminuir el efecto del tratamiento de la terapia génica mediada por vectores víricos. Las respuestas inmunitarias pueden ocurrir en forma de respuesta humoral (o respuesta mediada por anticuerpos) que reconoce antígenos o patógenos que se encuentran en la linfa o la sangre, y/o inmunidad mediada por células. Para minimizar las respuestas inmunitarias, se usan con frecuencia inmunosupresores tales como corticoesteroides en conexión con una administración de una terapia génica. Los fármacos inmunosupresores tienen efectos, por ejemplo, pueden provocar aumento de la presión intraocular, cataratas y otros eventos adversos (por ejemplo, el uso prolongado de inmunosupresores puede aumentar el riesgo de cáncer). Además de la respuesta inmunitaria, existen otras diferencias individuales entre los pacientes, por ejemplo, en respuesta a diferentes tipos (por ejemplo, diferente serotipo o diferente mutación/estructura de la cápside) de vectores, o en respuesta al mismo vector a la misma dosis.

Un método para reducir las respuestas inmunitarias a los vectores víricos, conservar la eficiencia de transducción, para reducir la dosis del vector vírico y/o del inmunosupresor, y/o para maximizar el efecto terapéutico en diferentes pacientes para la misma enfermedad genética, en la terapia génica mediada por vectores víricos, que comprende:

(a) establecer un conjunto de más de un vector vírico recombinante (por ejemplo, rAAV) con suficiente eficiencia de transducción en el tipo de célula diana para la terapia génica. El conjunto de vectores víricos se puede ampliar creando variantes con mutaciones de la región antigénica u otras mutaciones o variantes en las cápsides de dichos vectores víricos después de que dichas mutaciones o variantes se confirmen con suficiente eficiencia de transducción en células diana pertinentes para la enfermedad (por ejemplo, en estirpes celulares iPS-RPE o RPE para terapia génica con CYP4V2 para la BCD).

(b) detectar anticuerpos neutralizantes anti-vectores víricos (NAb) preexistentes contra diferentes serotipos de vectores víricos y/o mutaciones o variantes de la cápside en el sujeto que necesita la terapia génica, y/o someter a ensayo y comparar diferentes vectores víricos en células diana de enfermedades específicas de paciente (por ejemplo, células iPS-RPE) derivadas de dicho sujeto.

(c) seleccionar un vector vírico de dicho conjunto de vectores víricos con (i) suficiente eficiencia de transducción en las células diana de la enfermedad y (ii) baja reactividad cruzada con los NAb preexistentes en el sujeto, y/o (iii) buen resultado de rescate de fenotipo en células diana de la enfermedad específicas de paciente del sujeto (por ejemplo, estirpes celulares iPS-RPE o RPE específicas de paciente para la terapia génica con CYP4V2 para la BCD), en donde dicho conjunto de vectores víricos comprende diferentes serotipos y/o vectores víricos con cápside modificada (por ejemplo, incluyendo, sin limitación, AAV mutantes de la cápside y/o AAV variantes de la proteína de la cápside).

(d) usar el vector vírico seleccionado de (c) para la administración al sujeto.

(e) repetir (b) a (d) (solo la parte relacionada con los NAb preexistentes) anteriores cada vez que el sujeto requiere una administración de terapia génica, incluyendo, sin limitación, una administración de seguimiento al mismo órgano (por ejemplo, un ojo o un ojo contralateral), o a otro órgano.

Específicamente, se generaron y se sometieron a ensayo diversos vectores de rAAV, incluyendo cinco serotipos de AAV diferentes (AAV1, AAV2, AAV5, AAV8 y AAV9) y una mutación de la cápside AAV (AAV2.tri(Y-F)) para evaluar las diferencias entre las estirpes celulares de diferentes pacientes en este estudio.

Ejemplo 18: Uso de scAAV en rescate rápido de enfermedades de la retina y uso de EFS y/o SPA en un vector de scAAV o uno de AAV en el tratamiento de enfermedades oculares

Como se demuestra en el Ejemplo 13 anterior, el tratamiento con scAAV.CYP4V2 logró un rescate sólido del fenotipo bioquímico en células iPS-RPE de pacientes con BCD en muy poco tiempo (solo 4 días). Asimismo, scAAV.CYP4V2 mostró el rescate de la atrofia del RPE en la estirpe celular de iPS-RPE de paciente con BCD dos semanas después del tratamiento con AAV (véase la Figura 11). La expresión rápida y robusta en células iPS-RPE humanas impulsada por el promotor EFS (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 35) y SPA (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 36) en un vector de scAAV demostró la idoneidad del promotor EFS y/o SPA para impulsar una expresión transgénica en células oculares humanas y tratar enfermedades oculares humanas. El rápido rescate logrado por los vectores de scAAV con el promotor EFS y SPA los hace particularmente útiles en el tratamiento de enfermedades de rápida progresión o pacientes en fase avanzada de la enfermedad.

Asimismo, el estudio demostró la expresión rápida y robusta de un diseño de scAAV en células retinianas humanas. Esto hace que la terapia génica mediada por scAAV sea particularmente útil en el tratamiento de pacientes con enfermedades de la retina de aparición temprana o en el tratamiento de un paciente en fase avanzada que requiere un rescate rápido.

Análisis sobre la terapia génica con CYP4V2

La BCD es una enfermedad ocular rara que provoca ceguera para la que actualmente no existe ningún tratamiento aprobado disponible. En una investigación clínica que implica el uso de estirpes celulares de iPS-RPE específicas de paciente con BCD, la eficacia de diversos diseños de casetes de expresión y vectores de AAV.CYP4V2 para

rescatar el fenotipo en células iPS-RPE específicas de paciente con BCD se demostró en este estudio según lo evaluado mediante ensayos de ácidos grasos y lípidos. Asimismo, se sometieron a ensayo diferentes dosis (MOI) que pueden servir como directriz para determinar el intervalo de dosis para el tratamiento *in vivo*. Por último, no existe evidencia significativa de toxicidad asociada a la terapia génica con AAV.CYP4V2.

Ejemplos de terapia celular y terapia de edición génica por CRISPR

Ejemplo 19 - Uso de células iPSC, iPS-RPE o iPS-oculares de un sujeto con BCD en terapia celular

La BCD es una enfermedad de aparición relativamente tardía. Los síntomas en pacientes con BCD por lo general se desarrollan en la 2.^a, 3.^a o incluso 4.^a década de la vida. Asimismo, el proceso de reprogramación de IPS puede tener algún efecto de "reinicio del reloj". Por lo tanto, las células iPS-RPE y otras células iPS-oculares derivadas de un paciente con BCD pueden usarse como terapia celular para trasplante al paciente con BCD incluso sin ninguna reparación genética de las mutaciones de CYP4V2 en las células iPS-RPE.

Como alternativa, las iPSC, células iPS-RPE, iPS-PRC, células iPS-CE, iPS-CEC y/u otras células iPS-oculares derivadas de un paciente con BCD pueden repararse genéticamente antes del trasplante de terapia celular. La reparación genética se puede lograr mediante terapia génica con CYP4V2 como se describe en los Ejemplos anteriores o mediante edición génica. Véanse los Ejemplos del presente documento para obtener una descripción más detallada sobre la edición génica.

Ejemplo 20 - Células autólogas de pacientes reparadas genéticamente para terapia con células oculares

Pueden usarse células derivadas de iPSC específicas de paciente (por ejemplo, células iPS-RPE, iPS-CEC, células iPS-CE, iPS-PRC o células iPS-oculares) como fuente de células autólogas para el trasplante en terapia celular para enfermedades oculares, incluyendo, sin limitación, enfermedades de la retina y la córnea. En comparación con las células generadas a partir de fuentes alogénicas, tales como células ES (por ejemplo, células ES-RPE, ES-CEC o ES-PRC, y tejidos formados por dichas células derivadas de ES) o células iPS de otro individuo, dichas células autólogas derivadas de iPS específicas de paciente y tejidos elaborados a partir de dichas células generalmente requieren poca o ninguna inmunosupresión del paciente y no tienen problemas éticos relacionados con el uso de ES y células derivadas de ES.

Sin embargo, las iPSC generadas a partir de células de origen del paciente (por ejemplo, fibroblastos o células sanguíneas) y células y tejidos derivados de dichas iPSC específicas de paciente (por ejemplo, células iPS-RPE, iPS-PRC, iPS-CEC, células iPS-CE y células iPS-oculares específicas de paciente) todavía poseen mutaciones que provocan enfermedades y un fenotipo relacionado. Para generar células y/o tejidos sanos derivados de pacientes, las mutaciones patológicas pueden repararse o corregirse genéticamente con tecnología de edición génica, incluyendo, sin limitación, las repeticiones palindrómicas cortas agrupadas e interespaciadas regularmente (CRISPR), que puede diseñarse para corregir una mutación diana en la célula de un paciente. Después, estas iPSC sanas reparadas genéticamente pueden usarse para generar diversos tipos celulares (por ejemplo, células iPS-RPE, iPS-CEC, células iPS-CE, iPS-PRC u otras células iPS-oculares) que ya no albergan las mutaciones patológicas del paciente.

Además, este estudio de prueba de concepto demuestra que estas iPSC con genes corregidos y/o células derivadas de iPS con genes corregidos (por ejemplo, células iPS-RPE) ya no tienen el fenotipo (por ejemplo, perfil bioquímico anormal según lo evaluado mediante bioensayos, por ejemplo, lipidómica y/o proteómica) como se observa en células derivadas de iPS (sin corregir) del paciente. Por lo tanto, estas células con genes corregidos sirven como fuente de células autólogas reparadas genéticamente regenerativas que pueden usarse como células de reemplazo en terapia celular. En el presente documento y en los Ejemplos a continuación se describen en detalle composiciones y métodos relacionados con células autólogas de pacientes con genes corregidos.

Otro tipo de células de pacientes reparadas genéticamente son las iPSC de pacientes o las células derivadas de iPS (por ejemplo, células iPS-RPE, iPS-PRC, células iPS-CE, iPS-CEC y células iPS-oculares, células de neuronas iPS) tratadas mediante terapia de suplementación genética (por ejemplo, terapia génica con CYP4V2) como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Después del tratamiento de terapia génica, las células específicas de paciente poseen una copia sana del gen mutado (por ejemplo, un ADNc) y/o expresan una proteína funcional codificada por el transgén sano. Además, las células específicas de paciente tratadas con terapia génica demuestran un perfil bioquímico mejorado o normalizado u otro fenotipo observado en células del paciente no tratadas. Por lo tanto, también pueden usarse como fuente de células autólogas reparadas genéticamente para su uso como células de reemplazo en terapia celular, por ejemplo, células iPS-RPE iPS-PRC, iPS-CEC, células iPS-CE y células iPS-oculares específicas de paciente con BCD tratadas con terapia génica con CYP4V2 como células autólogas de pacientes reparadas genéticamente, para su uso en terapia celular para la BCD. En los Ejemplos anteriores del presente documento se describen en detalle composiciones y métodos relacionados con células específicas de paciente con BCD tratadas con terapia génica con CYP4V2. El análisis a continuación se centra en el tipo de reparación genética mediante la corrección de la mutación en el ADN genómico.

El reemplazo de células autólogas para enfermedades degenerativas oculares y retinianas asociadas a mutaciones genéticas depende de la capacidad de reparar la mutación patógena de un paciente corrigiendo genéticamente la mutación mediante la edición génica o de reparar o mitigar las consecuencias de la mutación (por ejemplo, mediante el suministro de una copia sana de un transgén con respecto al gen de la enfermedad, por ejemplo, terapia génica con CYP4V2) antes del trasplante. En este caso, se desarrollaron iPSC específicas de paciente a partir de un paciente con BCD con la mutación de CYP4V2 más común (c.802-8_810del17insGC) y los componentes de edición génica por CRISPR (ARN guía de CRISPR y molde donante) y diversas construcciones (plásmido y RNP) para corregir esta mutación. Aunque en el presente documento se usa CRISPR/Cas9 como medio para la edición génica, se prevé que pueden usarse otros sistemas CRISPR (por ejemplo, CpfI) y otras técnicas de edición génica, incluyendo, pero sin limitación, TALEN, así como técnicas de edición génica emergentes y futuras, tales como CRISPR/CpfI, para lograr resultados iguales o similares. También se espera que la edición génica pueda aplicarse no solo a las iPSC, sino también a las células fuente originales que se usarán para generar las iPSC, así como a las células generadas a partir de las iPSC, para corregir la mutación o mutaciones patógenas en dichas células.

Aunque las estirpes celulares derivadas de iPS se generan para cada paciente específico, su aplicación en terapia celular no tiene por qué ser así. Un factor clave que limita el uso generalizado de la terapia celular basada en iPSC son las diferencias inmunitarias entre los individuos humanos. Existen múltiples enfoques para resolver este problema. Por ejemplo, un enfoque es desarrollar una serie de bancos de células que contengan un número limitado de estirpes con haplotipos HLA comunes, diseñado para conseguir compatibilidad inmunitaria con una gran parte de la población de pacientes. Un banco de células de este tipo puede crearse generando iPSC de pacientes con haplotipos seleccionados o mediante manipulación genética de genotipos de HLA. Otro enfoque es producir un tipo de célula que sea inmunitariamente silenciosa independientemente del genotipo del paciente.

A continuación, se describen los métodos sobre cómo generar células autólogas específicas de paciente reparadas genéticamente, cómo evaluar el efecto de la reparación genética en las células y cómo usarlas en terapia celular. Los ejemplos proporcionados en el presente documento están relacionados con la generación de células autólogas de paciente reparadas genéticamente a partir de un paciente con BCD con la mutación c.802-8_810del17insGC en el gen CYP4V2, la mutación más común entre los pacientes con BCD. Pueden usarse los mismos métodos para generar células autólogas de pacientes reparadas genéticamente a partir de un paciente con una mutación diferente en CYP4V2, o un paciente con una mutación en otro gen asociado a una enfermedad ocular, o un paciente con una mutación en un gen asociado a otro tipo de enfermedades, incluyendo, sin limitación, en cualquier gen contenido en la Tabla 4.

Tabla 4

Lista de genes diana

ABCA4, ABCC6, ABHD12, ADAM9, AHI1, AIPL1, ALMS1, ARL13B, ARL6, ARMS2, ATXN7, BBS1, BBS10, BBS12, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS9, BEST1, C1QTNF5, C2, C2orf71, C3, C5orf42, C8orf37, CA4, CABP4, CACNA1F, CACNA2D4, CAPN5, CC2D2A, CDH23, CDH3, CDHR1, CEP164, CEP290, CEP41, CERKL, CFB, CFH, CHM, CHR2, CIB2, CLN3, CLN5, CLN6, CLN8, CLRN1, CNGA1, CNGA3, CNGB1, CNGB3, CNM4, COL11A1, COL2A1, COL9A1, CRBI, CRX, CYP4V2, DFNB31, DHDDS, EFEMP1, ELOVL4, ERCC6, EYS, FAM161A, FBLN5, FLVCR1, FSCN2, FZD4, GNAT1, GNAT2, GNPTG, GPR143, GPR179, GPR98, GRK1, GRM6, GRN, GUCA1A, GUCA1B, GUCY2D, HARS, HMCN1, HTRA1, IDH3B, IFT140, IFT80, IMPDH1, IMPG2, INPP5E, INVS, IQCB1, ITM2B, JAG1, KCNJ13, KCNV2, KCTD7, KIF11, KLHL7, LCA5, LRAT, LRIT3, LRP5, LZTFL1, MAK, MERTK, MFN2, MFRP, MFSD8, MKKS, MKS1, MT-ND4, MTPP, MYO7A, NDP, NEK4, NEK8, NMNAT1, NPHP1, NPHP3, NPHP4, NR2E3, NRL, NUB1, NYX, OA1, OAT, OCA1, OCA2, OFD1, OPA1, OPA3, OPN1LW, OPN1MW, OPN1SW, OTX2, PANK2, PAX2, PCDH15, PDE6A, PDE6B, PDE6C, PDE6G, PDE6H, PDGF, PDZD7, PEX1, PEX10, PEX14, PEX16, PEX19, PEX2, PEX5, PEX6, PEX7, PGK1, PHYH, PITPNM3, PLA2G5, PPT1, PRCD, PROM1, PRPF3, PRPF31, PRPF6, PRPF8, PRPH2, RAB28, RAX2, RBP3, RBP4, RD3, RDH12, RDH5, RDS, RGR, RGS9, RGS9BP, RHO, RIMS1, RLBP1, ROM1, RP1, RP1L1, RP2, RP9, RPE65, RPGR, RPGRIP1, RPGRIP1L, RS1, SAG, SDCCAG8, SEMA4A, SLC24A1, SLC45A2, SNRNP200, SPATA7, TEAD1, TIMM8A, TIMP3, TLR3, TLR4, TMEM126A, TMEM231, TMEM237, TMEM67, TOPORS, TPP1, TREX1, TRIM32, TRPM1, TSPAN12, TTC21B, TTC8, TTPA, TULP1, TYR, TYRP1, UNC119, USH1C, USH1G, USH2A, VCAN, VPS13B, WDPCP, WDR19, WFS1, WHRN, ZNF423, ZNF513, ACO2, AFG3L2, AUH, C12orf65, CISD2, CYP1B1, FOXC1, FOXF2, LTBP2, MTPAP, MYOC, NDUFS1, NR2F1, OPTN, PAX6, PITX2, POLG, SPG7, TEK, TXNRD2, ATXN2, ROBO3, PHOX2A, HOXA1, SALL4, CHN1, TUBB3, KIF21A, HOXB1, FAM47E, GBA, GCH1, HTRA2, LRRK2, PARK2, PINK1, SNCA, SYNJ1, NPC1, NPC2, CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4X1, CYP4Z1, CYP46A1

Usando BCD, una enfermedad con mutaciones de CYP4V2, como ejemplo, se generaron iPSC a partir de células específicas de paciente que portaban la mutación específica del paciente con BCD. Las iPSC específicas de paciente se transfectan con ARN guía de CRISPR (ARNg), endonucleasa Cas9 y molde de homología donante. Las copias del gen CYP4V2 muestran corrección de mutación y conversión al alelo de tipo silvestre. Después, las

iPSC corregidas se usan para generar células iPS-RPE con genes corregidos. Después, las células iPS-RPE con genes corregidos se analizan para confirmar que ya no tienen el fenotipo (por ejemplo, perfil bioquímico anormal (por ejemplo, perfil de ácidos grasos)). Estas células autólogas de pacientes reparadas genéticamente se pueden trasplantar (ya sea directamente [por ejemplo, suspensión celular] o en otras formas, tal como formando parte de una capa, una lámina, una matriz, un armazón o un tejido) al mismo paciente como una terapia celular autóloga para la BCD.

(i) Generación de estirpes de iPSC específicas de paciente con BCD:

se generaron iPSC a partir de células específicas de un paciente con BCD que portaba la mutación homocigótica c.802-8_810del17insGC en el gen CYP4V2 como se describe en el presente documento. Véase el Ejemplo 1 para consultar métodos para generar iPSC específicas de paciente. La mutación del paciente con BCD se identificó mediante secuenciación

(ii) Diseño, cribado y selección de componentes y construcciones de edición génica por CRISPR dirigidos a la mutación:

Véanse los Ejemplos del presente documento sobre la terapia de edición génica por CRISPR para obtener una descripción detallada.

(Se seleccionaron ARNg de CRISPR para minimizar la edición fuera de la diana y maximizar la especificidad con una secuencia diana directamente centrada en el sitio de mutación. Se examinaron múltiples ARNg con alta especificidad para la región que contiene la mutación de CYP4V2 específica del paciente. Los ARNg candidatos se insertaron por separado en un vector de expresión que también contenía la endonucleasa Cas9 responsable de mediar la escisión del ADN diana y se transfectaron en una estirpe celular 293. El ADN genómico del paciente se amplificó mediante PCR usando cebadores para la región CYP4V2 y los productos de la PCR se analizaron para determinar la actividad de escisión del ADN. Se usó un ensayo de encuesta para evaluar qué candidato de ARNg tiene una actividad relativamente alta para el sitio de mutación. Se usa el ARNg con mayor eficiencia de corte para la edición génica).

(iii) Edición génica en iPSC:

Véanse los Ejemplos a continuación sobre la terapia de edición génica por CRISPR para obtener una descripción detallada.

Para enfermedades genéticas recesivas como BCD, la corrección génica en un alelo o mutación es suficiente. Pueden usarse múltiples construcciones de CRISPR dirigidas a diferentes mutaciones para corregir múltiples mutaciones albergadas por una célula.

(iv) Generación de células iPS-RPE u otras células iPS-oculares a partir de iPSC con genes corregidos:

Después de confirmar la corrección precisa de la mutación patogénica con una edición fuera de la diana mínima o nula mediante secuenciación, la iPSC corregida mediante edición génica se usa para diferenciarse y generar células iPS-RPE u otro tipo de células iPS-oculares (por ejemplo, iPS-PRC, iPS-CEC, o células iPS-CE) afectadas por la enfermedad pertinente como se describe en el presente documento. Las células iPS-RPE corregidas derivadas del paciente con BCD después pasan por la misma confirmación del destino del RPE (por ejemplo, morfología distintiva del RPE (por ejemplo, pigmento y/o forma hexagonal) y/o marcadores específicos del RPE).

(v) Bioensayos para confirmar la ausencia de fenotipo

Se usan bioensayos para confirmar que estas iPSC con genes corregidos y/o células derivadas de iPS con genes corregidos (por ejemplo, células iPS-RPE) ya no tienen el fenotipo que se observa en las células derivadas de iPS (no corregidas) del paciente. Los bioensayos pueden ser cualquier tipo de ensayo biológico que pueda identificar y evaluar el fenotipo a nivel celular y/o molecular en células de pacientes con respecto a una enfermedad específica. Por ejemplo, pueden incluir sin limitación, lipidómica, proteómica, expresión de proteínas y/u otros ensayos bioquímicos. Para la BCD, el bioensayo incluye ensayos de ácidos grasos y ceramidas como se describe en los Ejemplos del presente documento. Los resultados indican que estas células iPS-RPE con genes corregidos derivadas del paciente con BCD ya no tienen el defecto/disfunción bioquímico pertinente como se observa en las células iPS-RPE no corregidas derivadas de pacientes con BCD. Esto demuestra que las células iPS-RPE con genes corregidos no tienen fenotipo y, por lo tanto, son una fuente de células de reemplazo adecuadas para la terapia celular.

(vi) Trasplante:

Estas células autólogas de pacientes reparadas genéticamente (por ejemplo, células iPS-RPE, iPS-PRC, células iPS-CE, iPS-CEC y otras células iPS-oculares) se pueden trasplantar (ya sea directamente o como parte de una capa, una lámina, una matriz, un armazón o un tejido) al mismo paciente como terapia celular para la BCD.

Ejemplo 21 - Ejemplo específico de terapia de edición génica por CRISPR para una enfermedad ocular

CRISPR/Cas9 es muy específico cuando los ARNg se diseñan correctamente, pero la especificidad y la edición fuera de diana siguen siendo una preocupación importante, particularmente porque CRISPR se está desarrollando para su uso clínico. El siguiente Ejemplo describe en detalle métodos para desarrollar construcciones de terapia

de edición génica por CRISPR con alta especificidad en la diana y bajo riesgo de edición fuera de la diana para su uso en el tratamiento de enfermedades oculares. Asimismo, la mutación c.802-8_810del17insGC representa una de las mutaciones más difíciles de corregir entre todas las mutaciones conocidas de CYP4V2 y otras enfermedades oculares genéticas. La mayoría de las mutaciones de CYP4V2 son cambios de un solo nucleótido, inserción o delección (Véase la Tabla 1: Mutaciones de CYP4V2 selectas entre pacientes con BCD), mientras que la mutación c.802-8_810del17insGC implica una delección de 17 pb y una inserción de 2 pb, y tanto un intrón como un exón.

Se diseñaron y construyeron varios conjuntos de construcciones de terapia de edición génica por CRISPR para corregir la mutación patológica más común de CYP4V2 (mutación c.802-8_810del17insGC). La siguiente es una descripción detallada del diseño, las composiciones y los métodos de uso de estas construcciones de edición génica por CRISPR de CYP4V2 para corregir la mutación y tratar la BCD.

(a) Análisis de la mutación

La mutación c.802-8_810del17insGC implica tanto un intrón como un exón, y tanto una delección como una inserción, y afecta a un sitio aceptor de corte y empalme.

La mutación c.802-8_810del17insGC se refiere a una delección de 17 bases con dos bases (GC) insertadas en el lugar que comienza a 8 bases del final del intrón 6 del gen CYP4V2, también denominada IVS6-8 del/insGC; Véase la SEQ ID NO: 46 que muestra la secuencia de la región de ADN genómico de CYP4V2 humano que comprende la mutación c.802-8_810del17insGC y la SEQ ID NO: 47 que muestra la secuencia de tipo silvestre correspondiente. La mutación c.802-8_810del17insGC se ilustra en la siguiente secuencia que muestra la unión intrón 6-exón 7 del CYP4V2 humano. La secuencia del intrón 6 se muestra en minúsculas y la secuencia del exón 7 en mayúsculas. La delección de 17 pb y la inserción de GC están entre paréntesis): se predice que caa aca gaa gca tgt gat tat cat tca aa (tca tac agG TCA TCG CT) (GC) GAA CGG GCC AAT GAA ATG AAC GCC AAT GA) dará como resultado la omisión del exón 7. El CYP4V2 de tipo silvestre tiene la siguiente secuencia: CAA ACA GAA GCA TGT GAT TAT CAT TCA AA(T CAT ACA GGT CAT CGC T)GA ACG GGC CAA TGA AAT GAA CGC CAA TGA (SEQ ID NO: 47), mientras que el mutante de c.802-8_810del17insGC CYP4V2 tiene la siguiente secuencia: CAA ACA GAA GCA TGT GAT TAT CAT TCA AA(G C)GA ACG GGC CAA TGA AAT GAA CGC CAA TGA (SEQ ID NO: 46). Los nucleótidos entre corchetes en la secuencia de tipo silvestre son los 17 nucleótidos que se eliminan y los nucleótidos entre corchetes en la secuencia mutante son los 2 nucleótidos que se insertan después de la delección de 17 pares de bases.

Para lograr una buena tasa de reparación usando CRISPR, se desea una escisión generada por Cas lo más cercana posible a la secuencia mutada. La región del ADN genómico de CYP4V2 que contiene la mutación c.802-8_810del17insGC tiene múltiples sitios PAM de SpCas9 (NGG). Por lo tanto, puede usarse SpCas9 normal para corregir esta mutación. Como alternativa, puede usarse Cas9 de otras especies, una Cas9 mutada u otra nucleasa de CRISPR (por ejemplo, Cpf1) con un PAM diferente (por ejemplo, TTTN para Cpf1 que está presente en la secuencia mutada) para corregir la mutación c.802-8_810del17insGC y/u otras mutaciones.

(b) Diseño y selección de ARNg de CRISPR

Basándose en los diversos sitios PAM presentes en la región de la mutación c.802-8_810del17insGC del gen CYP4V2, se cribaron múltiples secuencias de elementos protoespaciadores relacionados (en el presente documento denominados ARNg, normalmente tienen una longitud de 20 nt pero pueden tener diferentes longitudes, por ejemplo, 17-22 nt para su uso con Cas9) usando el software DeskGen. Se seleccionaron cinco (5) candidatos de ARNg usando los siguientes criterios: a) la proximidad del sitio de escisión de ARNg/Cas9 al sitio de corrección diana; y b) los perfiles fuera de la diana previstos del ARNg (Véase la Tabla 5 y la Figura 12; Véanse las SEQ ID NO: 48 a 52 para consultar secuencias de ARNg).

Tabla 5. Secuencias de ARNg candidatos

ARNg	Puntuación inespecífica	Secuencia
CYP4V2 g1	87	5'-TGA TTA TCA TTC AAA GCG AA CGG-3'
CYP4V2 g2	98	5'-GAT TAT CAT TCA AAG CGA AC GGG-3'
CYP4V2 g3	73	5'-GAT AAT CAC ATG CTT CTG TT TGG-3'
CYP4V2 g4	70	5'-TTC ATT GGC GTT CAT TTC AT TGG-3'
CYP4V2 g5	32	5'-CAC ATG CTT CTG TTT GGA CT TGG-3'

El sitio PAM correspondiente a cada ARNg candidato está resaltado en negrita. Para evitar confusión, la secuencia de PAM no forma parte de la secuencia de ARNg (elemento protoespaciador).

(c) Validación de ARNg usando ADN genómico de paciente

Se usó ADN genómico de un paciente con BCD (P1) con mutaciones c.802-8_810del17insGC homocigóticas para seleccionar y validar los ARNg. Se prepararon amplicones de ADN que flanquean una región de CYP4V2 que contiene el sitio de mutación y diversos sitios diana usando cebadores (véase la Tabla 6 y la Figura 12). Se mezclaron amplicones de ADN, ARN guía único (ARNgu) preparado mediante transcripción *in vitro* (IVT) (cada uno comprende uno de los ARNg1, ARNg2, ARNg3, ARNg4 o ARNg5) y la proteína SpCas9 y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. El ARNg activo medió para que la proteína Cas9 crease roturas bicatenarias en los amplicones y presentar diversos patrones de fragmentos (Tabla 7). Se cargaron las reacciones y los fragmentos de ADN se resolvieron en gel de agarosa al 1,5 % (Figura 13).

Tabla 6. Cebadores utilizados en la validación de ARNg

	Secuencias	Amplicón (pb)
CYP4V2 1F	5'-CAG AAA TCG CAA GCA TAG AGG GTG AAT TCA-3'	1062 pb
CYP4V2 1R	5'-CTG TTG GAG GGC TCT TAA CTG TCC-3'	

Tabla 7. Fragmentos de ADN previstos creados por ARNg activos

ARNg	Tamaño del amplicón de ADN (pb)	Tamaños de fragmentos (pb)	
g1	1062 pb	442	620
g2		443	619
g3		416	646
g4		455	607
g5		410	652

Para confirmar que los fragmentos realmente se originan a partir del amplicón, se sometieron a secuenciación de Sanger muestras de ADN del amplicón no tratado (Figura 16, panel superior) y el fragmento más pequeño del tratado con g2 (Figura 16, panel central) (Figura 14). Los 5 ARNg mostraron actividades de escisión previstas.

Además de o en lugar de la validación en el ADN genómico del paciente que alberga la mutación, las actividades de los ARNg también se pueden validar en células de pacientes, incluyendo, sin limitación, células somáticas, células madre, iPSC o células derivadas de una célula madre.

(d) Construcción de vectores que expresan ARNg

Se clonaron tres ARNg (g1, g2 y g3) con las actividades más altas y las puntuaciones más altas fuera de la diana en el vector de expresión de ARNg pX-U6-CBh-Cas9-Puro insertando un oligo casete bicatenario de cada ARNg activo. Cada casete se sintetizó basándose en una de las secuencias de ARNg de g1, g2 y g3. En la Figura 15 y la Figura 16 se proporcionan ilustraciones esquemáticas que muestran la construcción del vector de expresión y el sitio de inserción del ARNg. Véase la Figura 17 para obtener una ilustración más detallada (usando g1 como ejemplo) que muestra la secuencia entera de ARNg de IVT (SEQ ID NO: 55 (sin incluir la secuencia del elemento protoespaciador o el "G" opcional)) después del promotor U6. El nucleótido "G" (SEQ ID NO: 59) insertado al inicio de cada secuencia de elemento protoespaciador (ARNg) es opcional. Su objetivo principal es potenciar la eficiencia de la transcripción del promotor U6. No es necesario si la secuencia del elemento protoespaciador comienza con un resto "G" o si se usa un promotor no de UT (por ejemplo, el promotor H1). Todas las construcciones de ARNg se verificaron mediante digestión con enzimas de restricción y secuenciación.

Se desarrollaron tres plásmidos, cada uno de los cuales expresa un ARNg superior (g1, g2 o g3) y coexpresa genes de resistencia a hSpCas9 y puomicina, en concreto, pX459-hSpCas9-2A-Puro, (Figuras 15 y 16), y se incluyeron como una de las construcciones (véase la Tabla 8 a continuación) para la corrección génica de la mutación c.802-8_810del17insGC.

Se entenderá que el ARN guía, la proteína Cas y/o el marcador de selección (por ejemplo, gen de resistencia a puomicina y/o GFP, EGFP o RFP) pueden empaquetarse en un solo plásmido o en plásmidos separados. Además, cuando se usa más de un ARNg (ya sea para corregir múltiples mutaciones o para corregir la misma mutación, por ejemplo, un emparejamiento de ARNg para su uso con Cas9 Nickasa), se pueden empaquetar en el mismo vector o en vectores separados.

Además del vector plasmídico descrito en el presente documento, pueden usarse otros vectores diversos para empaquetar componentes de edición génica por CRISPR (ARN guía y/o proteína Cas) y/o marcador de selección, incluyendo, sin limitación, vector plasmídico pX458, vectores de virus adenoasociados (AAV) y/o vectores de

lentivirus. Además de las construcciones de ADN que codifican los componentes de CRISPR, el ARN guía, la proteína Cas y/o los marcadores de selección pueden usarse directamente o en una construcción de ARNm o una construcción de RNP.

5 (e) Construcción y validación de RNP de CRISPR

Además de una construcción de ADN en un vector (por ejemplo, un plásmido pX459 como se ha descrito anteriormente), se desarrolló una construcción de ribonucleoproteína (RNP) de CRISPR para cada uno de g1, g2, g3, g4 y g5 (Véanse las Tablas 5 y 8). Cada construcción de RNP comprende (i) un ARN guía único (ARNgu) quimérico que comprende el elemento protoespaciador pertinente (Véanse las Tablas 5 y 8 y la descripción detallada del presente documento); y (ii) una proteína SpCas9 que forma un complejo de ribonucleoproteína (RNP). Las actividades de escisión de diversas construcciones de RNP (ARNgu1:Cas9, ARNgu2:Cas9, ARNgu3:Cas9, ARNgu4:Cas9, ARNgu5:Cas9) en el sitio diana del gen CYP4V2 se validaron en el ADN genómico del paciente (Véanse las Figuras 12, 13 y 14) como se describe en el párrafo (c) anterior.

Un ARNgu normalmente tiene aproximadamente 100 nt de longitud, pero puede variar en longitudes y comprende una secuencia de elementos protoespaciadores de 17 nt-22 nt. Un ARNgu puede ser derivado de IVT o sintético. Los ARNgu de IVT correspondientes a g1, g2, g3, g4 y g5 se generaron y validaron como se ha descrito anteriormente. Los ARNgu sintéticos correspondientes a g1 y g2 se encargaron a medida a Synthego (Silicon Valley, CA, EE.UU.) como se describe a continuación.

En lugar de un ARNgu, puede usarse un dúplex de ARNcr (secuencia de ejemplo en la SEQ ID NO: 53) y ARNtracr (secuencia de ejemplo en la SEQ ID NO: 54) junto con una proteína Cas (por ejemplo, Cas9) para formar un complejo de RNP de CRISPR (ARNcr:ARNtracr:Cas9). Cuando se usa una proteína Cpf1, no se requiere ARNtracr.

Un ARNgu o ARNcr:ARNtracr se puede modificar químicamente para proteger contra la degradación de ARN intracelular. Por ejemplo, un ARN sintético modificado químicamente puede contener análogos de 2'-O-metilo y enlaces internucleotídicos de fosforotioato 3' en las tres bases terminales 5' y 3' del ARNg (Synthego (Silicon Valley, CA, EE.UU.)). Los ARNgu o ARNcr y ARNtracr sintéticos basados en una secuencia de elemento protoespaciador determinada (por ejemplo, CRISPR g1, g2, g3, g4 o g5 (Véanse las SEQ ID NO: 48 a 52) están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Synthego Corporation (Silicon Valley, CA, EE.UU.) o IDT, con modificación química disponible como opción.

35 (F) Construcción de molde donante

En una reparación dirigida por homología (HDR), se usa un molde donante para proporcionar la secuencia de ácido nucleico donante necesaria para corregir la secuencia mutada del gen diana. Se generaron dos moldes donantes independientes para HDR en forma de oligodesoxinucleótido monocatenario (ssODN). El primero, denominado molde donante 1 de CYP4V2 o ssODN 1 de CYP4V2 (SEQ ID NO: 56), contiene la corrección de 17 pb y tiene la secuencia a continuación: 5'-AGA AAA ATA AAT GAA AGA AAC TAG CAT ATT TTA TAA GAA AAT GTG TTA ACT AGG GTG CAT CCA AGT CCA AAC AGA AGC ATG TGA TTA TCA TTC AAA **TCA TAC AGG TCA TCG** CTG AAC GGG CCA ATG AAA TGA ACG CCA ATG AAG ACT GTA GAG GTG ATG GCA GGG GCT CTG CCC CCT CCA AAA ATA AAC GCA GGG CCT TT-3'; mientras que el segundo molde donante, denominado molde donante 2 de CYP4V2 o ssODN 2 de CYP4V2 (SEQ ID NO: 57) es el complemento inverso del molde donante 1 de CYP4V2.

Cualquiera de los moldes donantes puede usarse con cualquier ARNg o ARNgu (g1, g2, g3, g4 o g5) descrito anteriormente, y una proteína Cas9 para generar reparación dirigida por homología (HDR) para corregir la mutación diana CYP4V2 (c.802-8_810del17insGC).

Los moldes donantes proporcionados en el presente documento tienen una longitud de 200 nt. Pueden usarse moldes donantes de diversas longitudes. Un molde donante puede ser simétrico o asimétrico con respecto al sitio diana. Un molde donante puede ser proporcionado por un ADNmc, ssODN o un vector (por ejemplo, un plásmido o un vector de AAV) que contiene o que codifica la secuencia de ácido nucleico donante. Si el molde donante tiene una secuencia intacta complementaria con el elemento protoespaciador en el ARN guía de CRISPR y la secuencia PAM diana de la proteína Cas, para evitar que este molde donante sea degradado por la proteína Cas (por ejemplo, Cas9) en las células, pueden realizarse mutaciones en el molde donante, por ejemplo, para mutar el PAM de Cas9 "NGG" en el molde donante y cambiarlo a "NGT" u otra secuencia que no de PAM. Sin embargo, si la mutación de PAM prevista para ser introducida por el molde donante está dentro de la región codificante, es necesario tomar precauciones para garantizar que sea una mutación silenciosa.

Los moldes donantes pueden fabricarse sintéticamente y están disponibles en el mercado. Por ejemplo, los oligos de ADN de una secuencia determinada se pueden encargar a medida (oligonucleótidos de ADN Ultramer®, Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, Iowa, EE.UU.)

65 (g) Proteína Cas y marcador de selección

Las proteínas/nucleasas asociadas a CRISPR (Cas) (por ejemplo, Cas9 o Cpf1) están disponibles en el mercado, incluyendo, sin limitación, codificadas por un plásmido o como proteína recombinante para su uso en una construcción de RNP. Una proteína Cas también puede incluir una, dos o más secuencias de localización nuclear (NLS) (por ejemplo, n.º de catálogo: 1074182, Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, Iowa, EE.UU.; N.º de catálogo: A034a-a-1000, Feldan (Quebec, Canadá); Cpf1: N.º de catálogo: 1076158 (IDT)) y también puede fusionarse con un marcador de selección (por ejemplo, una proteína SpCas9 fusionada con EGFP, N.º de catálogo: PR-137211-E (Novatein Biosciences, Woburn, MA, EE.UU.).

Al transfectar una construcción de edición génica por CRISPR *in vitro* en las células, puede usarse un marcador de selección para evaluar la tasa de transfección y/o para ayudar a seleccionar las células para la siguiente etapa de procesamiento. En el proceso pueden usarse diversos marcadores de selección incluyendo, sin limitación, fluorescencia (por ejemplo, GFP, EGFP, RFP) y/o puromicina. Un marcador de selección puede integrarse con cualquier componente de una construcción de CRISPR o puede proporcionarse por separado en un proceso de transfección. Por ejemplo, se puede combinar un marcaje de fluorescencia con el ARNtracr (IDT) o la proteína Cas9 (Novatein Biosciences, n.º de catálogo: PR-137211-E) para obtener imágenes convenientes y la clasificación manual o por FACS de células transfectadas. Puede proporcionarse un gen de resistencia a puromicina en un vector que se cotransfecta con la construcción de CRISPR para la selección usando puromicina. La selección usando puromicina se ilustra en los Ejemplos. Los marcadores de selección de diversos tipos, como el marcador de selección de antibióticos (por ejemplo, puromicina) o el marcaje fluorescente, están disponibles en el mercado y pueden integrarse en un componente de CRISPR (por ejemplo, la proteína Cas9 o el ARN guía de CRISPR) o proporcionarse por separado (por ejemplo, un plásmido de expresión que expresa el gen de resistencia a puromicina), incluyendo, sin limitación: IDT, Sigma Aldrich, Novatein Biociencias, Clontech Laboratories e InvivoGen.

(h) Construcciones y protocolo recomendado

La siguiente tabla (Tabla 8) muestra las construcciones de edición génica por CRISPR (plásmido y RNP) generadas para cada uno de los 3 ARNg (ARNg1, ARNg2 y ARNg3). Contienen tres construcciones de plásmido de ARNg o ARNgu respectivos, dos moldes donantes (complementarios directo e inverso) y proteína SpCas9.

Tabla 8. Construcciones de plásmido y RNP para la Terapia de corrección génica por CRISPR de la mutación de CYP4V2 (c.802-8_810del17insGC)¹

Elemento n.º	Tipo	Nombre
1	Construcción de ADN/plásmido ²	CYP4V2-g1 (Véase la Tabla 5 y la SEQ ID NO: 48 para consultar la secuencia)
2	Construcción de ADN/plásmido ²	CYP4V2-g2 (Véase la Tabla 5 y la SEQ ID NO: 49 para consultar la secuencia)
3	Construcción de ADN/plásmido ²	CYP4V2-g3 (Véase la Tabla 5 y la SEQ ID NO: 50 para consultar la secuencia)
(continuación)		
Elemento n.º	Tipo	Nombre
4	RNAgu ³	CYP4V2-g1 (Véase la Tabla 5 y la SEQ ID NO: 48 para consultar la secuencia)
5	RNAgu ³	CYP4V2-g2 (Véase la Tabla 5 y la SEQ ID NO: 49 para consultar la secuencia)
6	RNAgu ³	CYP4V2-g3 (Véase la Tabla 5 y la SEQ ID NO: 50 para consultar la secuencia)
7	Molde donante ⁴	Molde donante 1 de CYP4V2 (véase párrafo (f) y SEQ ID NO: 56)
8	Molde donante ⁴	Molde donante 2 de CYP4V2 (véase párrafo (f) y SEQ ID NO: 57)
9	Proteína	SpCas9 (Véase la SEQ ID NO: 58 para consultar una secuencia de ejemplo)

Elemento n.º	Tipo	Nombre
1	Las construcciones para corregir la mutación c.802-8_810del17insGC, la mutación de CYP4V2 más común entre los pacientes con BCD. Los ARNg de CRISPR y las construcciones para corregir otras mutaciones de CYP4V2 se pueden diseñar y validar usando los métodos que se describen en el presente documento. Además de las construcciones de plásmido y RNP, también puede usarse otras construcciones que incluyen, sin limitación, ARNm y vector vírico, para proporcionar/expresar uno o más componentes de CRISPR.	
2	Un plásmido pX459 que codifica los componentes de CRISPR (ARNgu y proteína SpCas9) y el gen de resistencia a la puromicina (Puro) como marcador de selección. Véase la Figura 17 que muestra la construcción de ADN y la secuencia que codifica el ARNg (usando g1 como ejemplo, y las Figuras 15 y 16 para la construcción del vector y el mapa). Cada secuencia de ARNg contiene (a) un elemento protoespaciador de 20 nt (SEQ ID NO: 48, 49 o 50 para g1, g2 y g3, respectivamente), y (b) una secuencia de 82 nt (SEQ ID NO: 55 (secuencia mostrada en formato de ADN como se incluye en el ADN plasmídico; para la secuencia de RNA, usar "U" para reemplazar "T" en la secuencia de ADN). El vector pX459 contiene un nucleótido "G" (SEQ ID NO: 59 y Figura 17) inmediatamente después de la secuencia del promotor U6 humano y antes de la secuencia del elemento protoespaciador para potenciar la eficiencia de la transcripción impulsada por el promotor U6, que también se incluye en el ARNg derivado de IVT. Los componentes de CRISPR (ARNg y proteína Cas) también se pueden clonar en otros vectores, incluyendo, sin limitación, vectores víricos tales como vectores de lentivirus o vectores de AAV. El ARNg de CRISPR y la proteína Cas (por ejemplo, proteína Cas9) se pueden clonar en vectores separados o en un solo vector.	
3	ARNgu basado en diversos elementos protoespaciadores (CYP4V2 g1, CYP4V2 g2 o CYP4V2 g3, véanse la Tabla 5 y la SEQ ID NO: 48, 49 o 50, respectivamente). Véase la descripción anterior para consultar los ARNg de IVT. Además de los ARNg de IVT, se encargaron ARNg sintéticos con modificaciones químicas a Synthego Corporation (Silicon Valley, CA, EE.UU.). En lugar de ARNg, puede usarse un ARNcr (que comprende la secuencia protoespaciadora de 20 nt de CYP4V2 g1, g2 o g3, y la secuencia restante del ARNcr (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 53)) y un dúplex de ARNtracr (secuencia de ejemplo mostrada en la SEQ ID NO: 54).	
4	Un molde donante para la reparación dirigida por homología (HDR). También pueden usarse moldes donantes de diferentes longitudes y se pueden construir en diferentes formas, incluyendo, sin limitación, como ssODN o en un vector (por ejemplo, en un vector de virus adenoasociado (AAV) (por ejemplo, AAV2 o AAV6). La concentración de cada reactivo es de aproximadamente 1000 (ng/μl).	

Los siguientes protocolos son para suministrar construcciones de reparación génica por CRISPR de la mutación de CYP4V2 a las iPSC del paciente mediante electroporación y nucleofección. También pueden usarse otros métodos, incluyendo, sin limitación, lipofección, la transducción de vectores víricos (por ejemplo, lentivirus o vectores de AAV (por ejemplo, usar AAV6 para suministrar el molde donante) o microyección. Se usan iPSC de P1 de los pases 11 a 14.

Protocolo n.º 1 (Electroporación usando plásmidos):

1. Siguiendo las instrucciones del sistema de transfección Neon® (Life Technologies), usar una mezcla que contiene 2,5 μg (2,5 μl de solución madre) de pX459.ARNg (artículo n.º 1, 2 o 3). No combinar ARNg) y 2,5 μg (2,5 μl de solución madre) de ssODN (artículo n.º 7 u 8) para aproximadamente 1 millón de células.
2. Aplicar condiciones de electroporación (EP): a) 1 100 V, 30ms, 1 pulso; o b) 1200 V, 30 ms, 1 pulso.
3. Después de la EP, dividir uniformemente las células en 3 pocillos de una placa de 6 pocillos con inhibidor Rock (10 μM).
4. Dos días después de la siembra en placa, añadir puromicina como se indica en la Tabla 9.
5. Dos días después de añadir Puromicina, reemplazar los medios gastados con medios nuevos sin puromicina.
6. Mantener los cultivos durante 2 semanas antes de recoger colonias.

Tabla 9. Condiciones y nivel de concentración de puromicina para iPSC enfermas

	Concentración de puromicina (μg/ml)		
1100 V 30 ms 1p	0,1	0,15	0,2
1200V 30 ms 1p	0,1	0,15	0,2

Protocolo n.º 2 (Electroporación usando RNP):

1. Usar una cubeta de hielo. Descongelar un ARNg (artículo n.º 4, 5 o 6; no combinar ARNg), un molde donante de ssODN (artículo n.º 7 u 8) y proteína SpCas9 (artículo n.º 9), así como el vector de expresión Cas9-Puro en hielo. El vector de expresión Cas9-Puro se usa como marcador de selección. Es un plásmido pX459-hSpCas9-2A-Puro y tiene una estructura que se muestra en la Figura 15 excepto por que no se clonó en un ARNg.

2. Rotular claramente los tubos Eppendorf de 1,7 ml y las placas de 6 pocillos. Para cada muestra, preparar un tubo Eppendorf y 1 pocillo. Añadir 3 ml de medio de cultivo (TeSR-E8 de StemCell Technologies (n.º de cat. 05940)) en cada pocillo.
3. Preparar una placa de 10 cm con 25 ml de PBS para lavar la punta Neon®.
- 5 4. Preparar una placa de 6 pocillos para sembrar en placa las células electroporadas. Añadir 3 ml de medio de cultivo en cada pocillo.
5. En cada tubo Eppendorf, añadir 4 µg (4 µl de solución madre) de ARNg (Elemento 4, 5 o 6). No combinar ARNg y 10 µg (10 µl de solución madre) de proteína SpCas9 (artículo n.º 9), dejar el tubo a temperatura ambiente durante al menos 10 minutos.
- 10 6. Añadir 5 µg (5 µl de solución madre) de ssODN (artículo n.º 7 u 8) y 2,5 µg (2,5 µl de solución madre) del vector de expresión Cas9-Puro en cada tubo.
7. Resuspender las células en tampón Neon® EP R apropiado hasta densidad final 1×10^7 células/ml.
8. Tomar alícuotas de 105 µl de suspensión celular y añadir las a cada tubo Eppendorf con la mezcla de RNP de CRISPR.
- 15 9. Añadir 3 ml de tampón E2 a la pipeta Neon® y asentar la pipeta Neon® en la estación de pipeta Neon®.
10. Usar 100 µl de punta Neon®. Aspirar 100 µl de mezcla EP de cada tubo Eppendorf e insertarlos en la pipeta Neon®.
11. Aplicar una de las condiciones EP en la Tabla 9 anterior y seguir las etapas 3 a 6 del Protocolo n.º 1 anterior.
- 20 Nota: Si las iPSC no crecen bien, se recomienda acondicionar los medios. Recoger el medio gastado (sin puromicina) y filtrarlo para eliminar los residuos celulares. Mezclar en una relación de 1:1 de medio gastado y medio fresco. Se recomienda el uso de Matrigel (n.º de cat. de Corning 354277) y el medio TeSR-E8 de StemCell Technologies (n.º de cat. 05940) para cultivar iPSC humanas en condiciones sin alimentación durante todo el proceso de edición génica. La adición de inhibidor Rock (concentración final de 10 µM) al medio durante 48 horas cuando se siembran en placa las células después de EP ayudará a conservar la viabilidad celular.
- 25 *Protocolo n.º 3 (Nucleofección usando RNP):*
1. Lonza 4D-nucleofector, configuración de parámetros: programa Lonza, DS-150
2. Preparar RNP (cas9+ARNg) y ssODN por separado (llevar el volumen a un máximo de 10 µl), mezclar antes de usarlo. Véase la Tabla 10.
- 30 (1) ARNg1 +ssODN Directo de CYP4V2 (2) ARNg2 +ssODN Directo de CYP4V2
(3) ARNg1 +ssODN Inverso de CYP4V2 (4) ARNg2 +ssODN Inverso de CYP4V2

Tabla 10

Cada reacción del grupo	ARNg 30 µM (µl)	Cas9 20 µM (µl)	ssODN 30 µM (µl)	PBS (µl)
Células IPS de P1	4	1	4	1
tampón del kit/cada grupo	Volumen (µl) /muestra	4 muestras (µl)		
Solución	16,4	65,6		
Suplemento	3,6	14,4		

- 35 3. Recoger y contar células: 5×10^5 células iPS
4. Suspender la célula con RNP+ssODN (10 µl) pipeteando suavemente hacia arriba y hacia abajo 3-5 veces
5. Añadir 20 µl del tampón del kit Lonza a la suspensión celular, minimizar el tiempo de incubación antes de la nucleofección.
- 40 6. Cargar la mezcla (30 µl) en el pocillo del kit Lonza. Comprobar la impedancia.
7. Electroporar las células usando el parámetro de configuración (DS150).
8. Resuspender suavemente las células electroporadas añadiendo 70 µl de mTeSR (con inhibidor Rock) directamente en el pocillo del kit.
9. Sembrar en placa las células en medio de pase en un pocillo de una placa de 6 pocillos.
- 45 10. Observar la viabilidad celular 24 horas después de la electroporación y reemplazar el medio con medio de cultivo.

Nota: No se usa ningún marcador de selección para este protocolo. Las células que sobrevivieron a la nucleofección se seleccionan para la expansión de una sola célula. Además del programa Lonza DS-150, también pueden usarse otros parámetros tales como CB-150.

Ejemplo 22 - Generación de una estirpe celular de paciente reparada genéticamente y uso de RNP en la generación de una estirpe celular de paciente reparada genéticamente y en terapia con células oculares

- 55 Cada una de las construcciones de plásmido de expresión que contiene CRISPR g1 o g2 (artículo n.º 1 o 2) y la construcción de RNP de CRISPR que contiene ARNg1 o ARNg2 (artículo n.º 4 o 5, Synthego, Silicon Valley, CA, EE.UU.) y SpCas9 (artículo n.º 9, N.º de catálogo: A034a-a-1000 de Feldan (Quebec, Canadá), o de Synthego (por ejemplo, nucleasa Cas9 2NLS, *S. pyogenes*), junto con un molde donante de CYP4V2 (artículo n.º 7 o n.º 8, ssODN, oligonucleótidos de ADN ultrámero, Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, Iowa, EE.UU.), se usa

para transfectar iPSC de pacientes que albergan la mutación c.802-8_810del17insGC.

Evaluación de la corrección génica mediante reparación dirigida por homología (HDR):

- 5 Después de la transfección, las células seleccionadas se recogen para PCR seguida de una secuenciación de amplicones dirigida para evaluar la corrección génica en la región CYP4V2 que contiene la mutación c.802-8_810del17insGC. La secuenciación profunda de las células transfectadas muestra que las lecturas contenían una corrección precisa de la mutación, con inserción de "TCATACAGGTCATCGCT" de 17 pb y delección de "GC", dando como resultado la corrección de la mutación en la secuencia de tipo silvestre (SEQ ID NO: 47). La corrección de la mutación no se observa en ninguna iPSC de control no transfectada. Los resultados también sirven como indicación de la frecuencia de HDR entre las células transfectadas.

Obtención de clones de IPS con una edición fuera de la diana mínima o nula:

- 15 Después de evaluar la HDR, la transfección se realiza nuevamente en iPSC de pacientes que albergan la mutación c.802-8_810del17insGC. Las células transfectadas pasan por clonación y expansión unicelulares. Después se evalúan las estirpes celulares clonales con HDR en la diana confirmada para determinar su edición fuera de la diana mediante secuenciación. Para aplicaciones clínicas, se usa la secuenciación del genoma completo (cobertura de 60x) para comparar las estirpes celulares editadas y no transfectadas del mismo paciente. Se selecciona una estirpe celular clonal de IPS editada sin edición fuera de la diana o con una edición fuera de la diana mínima sin consecuencias materiales adversas conocidas en el genoma.

Diferenciación de IPS corregidas genéticamente en el tipo de células deseado

- 25 La estirpe celular clonal de IPS seleccionada se diferencia después en células IPS-RPE (Véanse los Ejemplos del presente documento). La estirpe celular clonal de IPS seleccionada se puede diferenciar en otros tipos celulares que se deseen para su uso en terapia celular (por ejemplo, células IPS-RPE, IPS-PRC, células IPS-CE, IPS-CEC u otras células IPS-oculares).

- 30 *Bioensayo para confirmar que las células IPS o derivadas de IPS reparadas genéticamente ya no tienen fenotipo*

- Las células IPS-RPE genéticamente corregidas (o reparadas genéticamente) se someten a ensayo para determinar su función bioquímica (Véase los Ejemplos del presente documento) y se confirma que ya no tienen el fenotipo que se observa en las células IPS-RPE de pacientes no tratados. Se detecta expresión de CYP4V2 en células IPS-RPE de pacientes reparadas genéticamente.

- A diferencia de un plásmido u otras construcciones de vectores (por ejemplo, AAV, lentivirus) que dan como resultado la expresión sostenida de los componentes de CRISPR que codifican (por ejemplo, ARNg, la nucleasa Cas y/o el molde donante), una construcción de RNP de CRISPR se enciende y se apaga rápidamente. Los componentes de una construcción de RNP se degradan relativamente rápido en las células transfectadas. Por lo tanto, el uso de construcciones de RNP reduce el riesgo de edición fuera de la diana en comparación con plásmidos y otras construcciones. Esto hace que la construcción de RNP sea particularmente adecuada para aplicaciones clínicas, tal como en la generación de células de pacientes regeneradas genéticamente adecuadas para el trasplante, así como para el tratamiento *in vivo* (por ejemplo, inyectar las construcciones de RNP en el ojo de un sujeto para la corrección génica *in vivo*). Además de tratar la BCD, las construcciones y métodos de RNP de CRISPR proporcionados en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de otras enfermedades, incluyendo enfermedades asociadas a un gen mutado o defectuoso expuesto en la Tabla 4.

Ejemplo 23: Uso de células reparadas genéticamente en terapia con células oculares

- 50 Las células IPS-RPE, IPS-PRC, IPS-CEC, células IPS-CE u otras células IPS-oculares reparadas genéticamente pueden trasplantarse al ojo del paciente como una terapia con células oculares. Por ejemplo, pueden usarse como células de reemplazo autólogas para células RPE muertas o degeneradas, fotorreceptores u otras células oculares en un paciente con BCD. Las células reparadas genéticamente se pueden trasplantar directamente (por ejemplo, suspensión celular) o en otras formas, incluyendo, sin limitación, como parte de una capa, una lámina, una matriz, un armazón o un tejido. La cantidad de células reparadas genéticamente utilizadas en un trasplante depende del tipo de célula diana del reemplazo, el tamaño del área que necesita células de reemplazo y el sujeto que se está tratando (por ejemplo, la edad, el sexo, el peso, la fase de desarrollo de la enfermedad y el estado del sujeto que se ha de tratar); la vía de administración; la ubicación del trasplante (por ejemplo, retina frente a córnea); la forma del trasplante (por ejemplo, suspensión celular frente a como parte de una capa, una lámina, una matriz, un armazón o un tejido); y la pauta necesaria. La cantidad de células en un único trasplante a un ojo de un tipo celular dado (por ejemplo, células RPE, fotorreceptores, CEC o células CE) pueden variar de aproximadamente 1.000 células a 10 millones de células.

- 65 En caso de que se requiera, las células pueden fabricarse en una instalación GMP para su uso clínico. Las instalaciones GMP para productos de terapia celular están disponibles en el mercado a través de institutos de

investigación, organizaciones de fabricación por contrato (CMO) y organizaciones de investigación por contrato (CRO), por ejemplo, Servicios integrados de terapia celular en la Universidad Case Western Reserve, Centro de Terapia Celular y Genética de la Facultad de Medicina de Baylor, CELLforCURE, Fundación de Células Madre de Nueva York y Lonza.

La administración autóloga específica del paciente puede usar los mismos métodos de administración/suministro que se usan en la terapia con células oculares alogénicas (por ejemplo, trasplante de RPE derivado de células madre embrionarias (ES-RPE)) para enfermedades de degeneración de la retina, incluyendo las afectadas por la degeneración del RPE, tales como la degeneración macular relacionada con la edad (DME). Dichos métodos de administración/quirúrgicos se conocen en la técnica.

Ejemplo 24 - Tratamiento de combinación de terapia génica y terapia celular para enfermedades oculares

Las divulgaciones del presente documento divulgan composiciones y métodos para su uso en terapia génica y terapia celular para la BCD. Para las enfermedades oculares, la terapia génica y la terapia celular tienen cada una sus ventajas y desventajas. Por un lado, la terapia génica funciona mejor en la fase temprana o media de la enfermedad, cuando al paciente todavía le quedan muchas células retinianas (u oculares) para recibir y ser rescatado mediante el tratamiento de terapia génica. Sin embargo, la terapia génica no funciona bien o puede no funcionar en absoluto en pacientes en fase avanzada a quienes ya no les quedan células oculares pertinentes (por ejemplo, RPE o PRC). La terapia celular, por otra parte, proporciona células de reemplazo para reemplazar las células muertas o degeneradas en el ojo del paciente y tiene sus ventajas sobre la terapia génica, particularmente para pacientes en fase avanzada y enfermedades de herencia dominante. Sin embargo, la terapia celular no puede rescatar las células "originales" restantes en el ojo del paciente, cuya supervivencia no solo conserva la visión restante del paciente, sino que también beneficia la integración de las células de reemplazo.

Para superar las limitaciones de la terapia génica y la terapia celular y brindar los máximos beneficios a los pacientes, se desarrolló un método de tratamiento de combinación de terapia génica y terapia celular para la BCD, que también puede usarse para otras enfermedades oculares. Comprendiendo dichos métodos:

- (a) aplicar terapia génica (por ejemplo, terapia génica con AAV.CYP4V2 o terapia de corrección génica por CRISPR) en el ojo del paciente *in vivo*; y
- (b) generación *in vitro* de células oculares iPS autólogas específicas de paciente reparadas genéticamente (por ejemplo, células iPS-RPE, iPS-PRC, células iPS-CE, iPS-CEC u otros tipos celulares oculares afectados por la enfermedad) y trasplantar estas células al ojo del paciente.

en donde (a) y (b) se pueden aplicar secuencialmente (primero (a) después (b), o primero (b) después (a)) o simultáneamente (por ejemplo, inyectando células y vectores de terapia génica en una administración). Cada uno de (a) o (b) puede aplicarse una o más veces al mismo ojo. Dependiendo de la enfermedad, la fase de la enfermedad y la situación individual del paciente, (a) y (b) pueden dirigirse a los mismos tipos o a diferentes tipos celulares oculares. Por ejemplo, en el caso de la BCD, los vectores de terapia génica impulsados por un promotor ubicuo pueden dar como resultado la expresión de CYP4V2 en células RPE, fotorreceptores y otras células retinianas, mientras que la terapia celular puede centrarse en proporcionar células RPE y/o fotorreceptores regenerados.

En este caso, la terapia celular los puede beneficiar proporcionando células nuevas (por ejemplo, células RPE o fotorreceptoras), mientras que la terapia génica puede mejorar el efecto de la terapia celular rescatando las células RPE o fotorreceptoras restantes y/o mejorando las condiciones de las células coroides cuya salud afecta a las condiciones de las células oculares. La combinación del efecto de "rescate" y "reemplazo" de la terapia génica y la terapia celular, respectivamente, hace que el tratamiento de combinación sea una mejora con respecto a la terapia génica o la terapia celular. Este método de tratamiento de combinación puede aplicarse a enfermedades oculares y a enfermedades provocadas por una o más mutaciones genéticas, incluyendo, sin limitación, enfermedades asociadas a un gen mutado o defectuoso expuesto en la Tabla 4.

SECUENCIAS

LISTADO DE SECUENCIAS

* Todos los números de referencia utilizados en las secuencias son números de referencia del NCBI a menos que se indique otra cosa.

Parte I: Secuencias de terapia génica

A. ADNc y secuencias de proteína CYP4V2 funcional

SEQ ID NO: 1 - una secuencia de ADNc (1578 pb) que codifica la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4), denominada en el presente documento CYP4V2st.

SEQ ID NO: 2 - una secuencia de ADNc con codones optimizados (1578 pb) que codifica la proteína CYP4V2 humana (SEQ ID NO: 4), denominada en el presente documento CYP4V2op.

SEQ ID NO: 3 - una secuencia de ADNc (1578 pb) que codifica una proteína CYP4V2 funcional (SEQ ID NO: 5), denominada en el presente documento CYP4V2fv.

SEQ ID NO: 4 - secuencia de aminoácidos (525 aa) de la proteína CYP4V2 humana (NP_997235.3)

SEQ ID NO: 5 - secuencia de aminoácidos (525 aa) de una variante funcional de la proteína CYP4V2 humana

SEQ ID NO: 6 - fragmento de proteína CYP4V2 humana sin dominio transmembrana (490 aa)

SEQ ID NO: 7 - secuencia de aminoácidos de CYP46A1 humana

SEQ ID NO: 8 - secuencia de aminoácidos de CYP4A11 humana

SEQ ID NO: 9 - secuencia de aminoácidos de CYP4A22 humana

SEQ ID NO: 10 - secuencia de aminoácidos de CYP4B1 humana

SEQ ID NO: 11 - secuencia de aminoácidos de CYP4F2 humana

SEQ ID NO: 12 - secuencia de aminoácidos de CYP4F3 humana

SEQ ID NO: 13 - secuencia de aminoácidos de CYP4F8 humana

SEQ ID NO: 14 - secuencia de aminoácidos de CYP4F11 humana

SEQ ID NO: 15 - secuencia de aminoácidos de CYP4F12 humana

SEQ ID NO: 16 - secuencia de aminoácidos de CYP4F22 humana

SEQ ID NO: 17 - secuencia de aminoácidos de CYP4X1 humana

SEQ ID NO: 18 - secuencia de aminoácidos de CYP4Z1 humana

SEQ ID NO: 19 - secuencia de aminoácidos de CYP4V2 de chimpancé

SEQ ID NO: 20 - secuencia de aminoácidos de CYP4V2 de macaco de la India

SEQ ID NO: 21 - secuencia de aminoácidos de CYP4V2 de perro

SEQ ID NO: 22 - secuencia de aminoácidos de CYP4V2 de vaca

SEQ ID NO: 23 - secuencia de aminoácidos de CYP4V2 de ratón doméstico

SEQ ID NO: 24 - secuencia de aminoácidos de CYP4V2 de rata parda

SEQ ID NO: 25 - secuencia de aminoácidos de CYP4V2 de pollo

SEQ ID NO: 26 - secuencia de aminoácidos de CYP4V2 de sapo acuático tropical

SEQ ID NO: 27 - secuencia de aminoácidos de CYP4V2 de caballo

SEQ ID NO: 28 - secuencia de aminoácidos de CYP4V2 de conejo

SEQ ID NO: 29 - secuencia de aminoácidos de CYP4V2 de mosca de la fruta

SEQ ID NO: 30 - secuencia de elementos distintivos de P450

SEQ ID NO: 31 - secuencia de elementos distintivos de P450

B. Secuencias reguladoras de ejemplo y secuencias de ITR

SEQ ID NO: 32 - secuencia del promotor CAG

SEQ ID NO: 33 - secuencia del potenciador WPRE

SEQ ID NO: 34 - secuencia de PolíA de bGH

SEQ ID NO: 35 - secuencia del promotor EFS

SEQ ID NO: 36 - secuencia de políA pequeña (SPA)

SEQ ID NO: 37 - secuencia Kozak

SEQ ID NO: 38 - secuencia Kozak

SEQ ID NO: 39 - secuencia PolíA tardía de SV40

SEQ ID NO: 40 - secuencia del promotor CMV

SEQ ID NO: 41 - secuencia del promotor EF-1 alfa

SEQ ID NO: 42 - secuencia de ITR izquierda 5' de AAV2

SEQ ID NO: 43 - secuencia de ITR derecha 3' de AAV2

SEQ ID NO: 44 - secuencia de ITR 5' de AAV2 mutante utilizada en scAAV

SEQ ID NO: 45 - secuencia de ITR 3' de AAV2 utilizada en scAAV

Parte II. Secuencias de terapia celular

SEQ ID NO: 46 - región del gen CYP4V2 humano que contiene la mutación c.802-8_810del17insGC

SEQ ID NO: 47 - región del gen CYP4V2 humano de tipo silvestre sin la mutación c.802-8_810del17insGC

SEQ ID NO: 48 - ARNg 1

SEQ ID NO: 49 - ARNg 2

SEQ ID NO: 50 - ARNg 3

SEQ ID NO: 51 - ARNg 4

SEQ ID NO: 52 - ARNg 5

SEQ ID NO: 53 - secuencia de ejemplo de ARNcr

SEQ ID NO: 54 - secuencia de ejemplo de ARNtracr

SEQ ID NO: 55 - secuencia de ejemplo de ARNg

SEQ ID NO: 56 - secuencia del molde donante 1

SEQ ID NO: 57 - secuencia del molde donante 2

SEQ ID NO: 58 - secuencia de aminoácidos de SpCas9

SEQ ID NO: 59 - nucleótido adicional insertado inmediatamente después de la secuencia del promotor U6 y antes de la secuencia del elemento protoespaciador en una construcción de plásmido y en un ARNg de IVT

Parte III: Secuencias de casete de expresión de CYP4V2 (incluidas ITR de AAV y secuencias de unión/enlazador).

SEQ ID NO: 60 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op y AAV5.CYP4V2op.

SEQ ID NO: 61 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en AAV5.CYP4V2st. AAV5.CYP4V2st tiene el mismo promotor (CAG), potenciador (WPRE) y poliA (poliA-bGH) que AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op y AAV5.CYP4V2op (SEQ ID NO: 60) pero secuencias de ADNc y unión/enlazador de CYP4V2 diferentes.

SEQ ID NO: 62 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en AAV8.CYP4V2fv. AAV8.CYP4V2fv tiene el mismo promotor (CAG), potenciador (WPRE) y poliA (poliA-bGH) y secuencias de unión/enlazador que AAV5.CYP4V2st (SEQ ID NO: 61) y difiere solo en la secuencia de ADNc de CYP4V2.

SEQ ID NO: 63 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en AAV5.CYP4V2op (nuevo). AAV5.CYP4V2op (nuevo) tiene el mismo promotor (CAG), potenciador (WPRE) y poliA (poliA-bGH) y las mismas secuencias de unión/enlazador que AAV5.CYP4V2st (SEQ ID NO: 61) y AAV8.CYP4V2fv (SEQ ID NO: 62), pero secuencias de ADNc de CYP4V2 diferentes.

SEQ ID NO: 64 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en scAAV1.CYP4V2op, scAAV5.CYP4V2op y scAAV9.CYP4V2op.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 (ADNc de CYP4V2st, 1578 pb)

ATGGCGGGGCTCTGGCTGGGGCTCGTGTGGCAGAAGCTGCTGCTGTGGGGCGCGGCGAGTGCCCTTTCCC
TGGCCGGCGCCAGTCTGGTCCTGAGCCTGCTGCAGAGGGTGGCGAGCTACGCGCGGAAATGGCAGCAGAT
GCGGCCCCATCCCCACGGTGGCCCGCGCCTACCCACTGGTGGGCCACGCGCTGCTGATGAAGCCGGACGGG
CGAGAATTTTTTTCAGCAGATCATTGAGTACACAGAGGAATACCGCCACATGCCGCTGCTGAAGCTCTGGG
TCGGGCCAGTGCCCATGGTGGCCCTTTATAATGCAGAAAATGTGGAGGTAATTTTAACTAGTTCAAAGCA
AATTGACAAATCCTCTATGTACAAGTTTTTAGAACCATGGCTTGGCCTAGGACTTCTTACAAGTACTGGA
AACAAATGGCGCTCCAGGAGAAAGATGTAAACACCCACTTTCCATTTTACCATTCTGGAAGATTTCTTAG
ATATCATGAATGAACAAGCAAATATATTGGTTAAGAACTTGAAAAACACATTAACCAAGAAGCATTAA
CTGCTTTTTTTACATCACTCTTTGTGCCTTAGATATCATCTGTGAAACAGCTATGGGGAAGAATATTGGT
GCTCAAAGTAATGATGATTCCGAGTATCTCCGTGCAGTTTATAGAATGAGTGAGATGATATTTTCAAGAA
TAAAGATGCCCTGGCTTTGGCTTGATCTCTGGTACCTTATGTTTAAAGAGGATGGGAACACAAAAGAG
CCTTCAGATCCTACATACTTTTACCAACAGTGTCTATCGCTGAACGGGCCAATGAAATGAACGCCAATGAA
GACTGTAGAGGTGATGGCAGGGGCTCTGCCCCCTCCAAAATAAACGCAGGGCCTTTCTTGACTTGCTTT
TAAGTGTGACTGATGACGAAGGGAACAGGCTAAGTCATGAAGATATTCGAGAAGAAGTTGACACCTTCAT
GTTTGAGGGGCGACGATACAACCTGCAGCTGCAATAAACTGGTCCTTATACCTGTTGGGTCTAACCCAGAA
GTCCAGAAAAAAGTGGATCATGAATTGGATGACGTGTTTGGGAAGTCTGACCGTCCCGCTACAGTAGAAG
ACCTGAAGAACTTCGGTATCTGGAATGTGTTATTAAGGAGACCCTTCGCCTTTTCTCTCTGTTCCTTT
ATTTGCCCGTAGTGTAGTGAAGATTGTGAAGTGGCAGGTTACAGAGTTCTAAAAGGCACTGAAGCCGTC
ATCATTTCCCTATGCATTGCACAGAGATCCGAGATACTTCCCCAACCCGAGGAGTTCCAGCCTGAGCGGT
TCTTCCCCGAGAATGCACAAGGGCGCCATCCATATGCCTACGTGCCCTTCTCTGCTGGCCCCAGGAAGT
TATAGGTCAAAAGTTTGTGTGATGGAAGAAAAGACCATTCTTTCGTGCATCCTGAGGCACCTTTGGATA
GAATCCAACCAGAAAAGAGAAGAGCTTGGTCTAGAAGGACAGTTGATTCTTCGTCCAAGTAATGGCATCT
GGATCAAGTTGAAGAGGAGAAATGCAGATGAACGCTAA

SEQ ID NO: 2 (ADNc de CYP4V2op, 1578 pb)

ATGGCTGGACTGTGGCTGGGACTGGTGTGGCAGAACTGCTGCTGTGGGGGGCCGCTTCCGCACTGTAC
TGGCTGGGGCTTCACTGGTGTGAGCCTGCTGCAGAGGGTGGCCTCCTACGCCAGAAAGTGGCAGCAGAT
GAGGCCCATCCCTACCGTGGCCAGAGCCTATCCACTGGTGGGACACGCACTGCTGATGAAGCCTGACGGC
AGAGAGTTCTTTTACGAGATCATCGAGTACACAGAGGAGTATAGGCACATGCCACTGCTGAAGCTGTGGG
TGGGACCCGTGCCTATGGTGGCCCTGTACAACGCCGAGAATGTGGAAGTGATCCTGACCAGCAGCAAGCA
GATCGATAAGTCTAGCATGTATAAGTTCTTGGAGCCTTGGCTGGGCCTGGGCCTGCTGACCTCTACAGGC
AACAAAGTGGAGGAGCCGGAGAAAGATGCTGACCCCAACATTCACCTTTACAATCCTGGAGGACTTCCTGG
ACATCATGAACGAGCAGGCCAATATCCTGGTGAAGAAGCTGGAGAAGCACATCAACCAGGAGGCCCTTTAA
TTGCTTCTTTTACATCACCCCTGTGCGCCCTGGACATCATCTGTGAGACAGCTATGGGCAAGAACATCGGC
GCCCAGTCTAATGACGATAGCGAGTACCTGCGGGCCGTGTATAGAATGAGCGAGATGATCTTTAGGCGCA
TCAAGATGCCCTGGCTGTGGCTGGATCTGTGGTATCTGATGTTCAAGGAGGGCTGGGAGCACAAGAAGTC
CCTGCAGATCCTGCACACCTTTACAACTCTGTGATCGCCGAGAGAGCCAATGAGATGAACGCCAATGAG
GACTGTAGGGGCGATGGAAGGGGACGCGCCCTTCCAAGAACAAGCGGAGAGCCTTCTTGGACCTGCTGC
TGAGCGTGACCGACGATGAGGGCAATCGCCTGTCCACGAGGACATCCGGGAGGAGGTGGATACATTCAT
GTTTGAGGGACACGACACCACAGCCGCGCCATCAACTGGTCCCTGTACCTGCTGGGCTCTAATCCAGAG
GTGCAGAAGAAGGTGGATCACGAGCTGGACGACGTGTTCCGCAAGTCCGACAGGCCAGCAACCGTGGAGG
ATCTGAAGAAGCTGAGATACCTGGAGTGCCTGATCAAGGAGACACTGCGCCTGTTCCCTCTGTGCCTCT
GTTTGCCCGGTCCGTGTCTGAGGACTGTGAGGTGGCCGGCTATCGCGTGCTGAAGGGCACCAGGCCCTG
ATCATCCCTTACGCCCTGCACCGGGACCCAGGTATTTCCCTAACCAGAGGAGTTTCAGCCAGAGAGAT
TCTTTCCCGAGAATGCCAGGGCAGGCACCCCTTACGCCTATGTGCCATTCTCCGCCGACCAAGGAAGTC
CATCGGACAGAAGTTTGGCGTGTGAGGAGAAAACCATCCTGTCTTGTATCCTGAGACACTTCTGGATC
GAGAGCAATCAGAAGAGGGAGGAGCTGGGCCTGGAGGGACAGCTGATCCTGCGGCCAAGCAACGGCATCT
GGATCAAACTGAAAAGAAGGAACGCTGACGAGAGGTAA

SEQ ID NO: 3 (ADNc de CYP4V2fv, 1578 pb)

ATGGCGGGGCTCTGGCTGGGGCTCGTGTGGCAGAAGCTGCTGCTGTGGGGCGCGCGGAGTGCCCTTTCCC
TGGCCGGCGCCAGTCTGGTCCTGAGCCTGCTGCAGAGGGTGGCGAGCTACGCGCGGAAATGGCAGCAGAT
GCGGCCCATCCCCACGGTGGCCCGCCCTACCCACTGGTGGGCCACGCGCTGCTGATGAAGCCGGACGGG
CGAGAATTTTTTACGAGATCATTGAGTACACAGAGGAATACCGCCACATGCCGCTGCTGAAGCTCTGGG
TCGGGCCAGTGCCCATGGTGGCCCTTTATAATGCAGAAAATGTGGAGGTAATTTTAACTAGTTCAAAGCA
AATTGACAAATCCTCTATGTACAAGTTTTTAGAACCATGGCTTGGCCTAGGACTTCTTACAAGTACTGGA
AACAAATGGCGCTCCAGGAGAAAGATGTTAACACCCACTTTCATTTTACCATTCTGGAAGATTTCTTAG
ATATCATGAATGAACAAGCAAATATATTGGTTAAGAACTTGAAAAACACATTAACCAAGAAGCATTATA
CTGCTTTTTTTTACATCACTCTTTGTGCCTTAGATATCATCTGTGAAACAGCTATGGGGAAGAATATTGGT
GCTCAAAGTAATGATGATTCCGAGTATGTCCGTGCAGTTTATAGAATGAGTGAGATGATATTTCCAAGAA
TAAAGATGCCCTGGCTTTGGCTTGATCTCTGGTACCTTATGTTTAAAGAAGGATGGGAACACAAAAAGAG
CCTTAAGATCCTACATACTTTTACCAACAGTGTCTATCGCGGAACGGGCCAATGAAATGAACGCCAATGAA
GACTGTAGAGGTGATGGCAGGGGCTCTGCCCCCTCCAAAAATAAACGCAGGGGCTTTCTTGACTTGCCTT
TAAGTGTGACTGATGACGAAGGGAACAGGCTAAGTCATGAAGATATTCGAGAAGAAGTTGACACCTTCAT
GTTTGAGGGGCACGATACAACGAGCTGCAATAAACTGGTCCTTATACCTGTTGGGTTCTAACCAGAA
GTCCAGAAAAAAGTGGATCATGAATTGGATGACGTGTTTGGGAAGTCTGACCGTCCCGCTACAGTAGAAG
ACCTGAAGAAACTTCGGTATCTGGAATGTGTTATTAAGGAGACCTTCGCCTTTTTCCTTCTGTTCCTTT
ATTTGCCCGTACTGTTAGTGAAGATTGTGAAGTGGCAGGTTACAGAGTTCTAAAAGGCACTGAAGCCGTC
ATCATTCCCTATGCATTGCACAGAGATCCGAGATACTTCCCCAACCCGAGGAGTTCCAGCCTGAGCGGT
TCTTCCCCGAGAATGCACAAGGGCGCCATCCATATGCCTACGTGCCCTTCTCTGCTGGCCCCAGGAAGTC
TATAGGTCAAAAGTTTGTGTGATGGAAGAAAAGACCATTCTTTCGTGCATCCTGAGGCACTTTTGGATA
GAATCCAACCAGAAAAGAGAAGAGCTTGGTCTAGAAGGACAGTTGATTCTTCGTCCAAGTAATGGCATCT
GGATCAAGTTGAAGAGGAGAAATGCAGATGAACGCTAA

5

SEQ ID NO: 4 (proteína CYP4V2 humana, NP_997235.3, 525 aa)

MAGLWLGLVWQKLLWGAASALSLAGASLVLSLLQRVASYARKWQQMRPIPTVARAYPLVGHALLMKPDG
REFQQIIEYTEEYRHMPLLLKLWVGPVPMVALYNAENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLEPWGLGLLSTG
NKWRSRRKMLTPTFHTILEDFLDIMNEQANILVKKLEKHINQEAFFYITLCALDIICETAMGKNIG
AQSNDDSEYVRAVYRMSEMI FRRIKMPWLWLDLWYLMFKEGWEHKKSLQILHTFTNSVIAERANEMNANE
DCRGDGRGSAPSKNKRRAFLDLLSVTDDEGNRLSHEDIREVDTFMFEGHDTTAAAINWSLYLLGSNPE
VQKKVDHELDDVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECVIKETLRLFPSVPLFARSVSEDCEVAGYRVLKGTAV
IIPYALHRDPRYFPNPEEFQPERFFPENAQGRHPYAYVPFSAGPRNCIGQKFVMEEEKTILSCILRHFWI
ESNQKREELGLEQLILRPSNGIWIWIKLRNRADER

10

SEQ ID NO: 5 (variante funcional de la proteína CYP4V2 humana; 525 aa)

MAGLWLGLVWQKLLWGAASALSLAGASLVLSLLQRVASYARKWQQMRPIPTVARAYPLVGHALLMKPDG
 REFFQQIIEYTEEYRHMPLLLKLWVGVPVPMVALYNAENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLEPWGLGLLTSTG
 NKWRSRRKMLTPTFHFTILEDFLDIMNEQANILVKKLEKHINQEAFNCFYITLCALDIICETAMGKNIG
 AQSNDDSEYVRAYRMSEMI FRRIKMPWLWLDLWYLMFKEGWEHKKSLKILHTFTNSVIAERANEMNANE
 DCRGDGRGSAPSKNKRR AFLDLLSVTDDEGNRLSHEDIREVDTFMFEGHDTTAAAINWSLYLLGSNPE
 VQKKVDHELDDVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECVIKETLRLFPSVPLFARSVSEDCEVAGYRVLKGTEAV
 IIPYALHRDPRIYFPNPEEFQPERFFPENAQGRHPYAYVPFSAGPRNCIGQKFVMEEEKTILSCILRHFWEI
 ESNQKREELGLEGLILRPSNGIWKLRNADER

SEQ ID NO: 6 (fragmento funcional de CYP4V2 (que carece de dominio transmembrana; 490 aa)

RVASYARKWQQMRPIPTVARAYPLVGHALLMKPDGREFFQQIIEYTEEYRHMPLLLKLWVGVPVPMVALYNA
 ENVEVILTSSKQIDKSSMYKFLEPWGLGLLTSTGNKWRSRRKMLTPTFHFTILEDFLDIMNEQANILVK
 KLEKHINQEAFNCFYITLCALDIICETAMGKNIGAQSNDDSEYVRAYRMSEMI FRRIKMPWLWLDLWY
 LMFKEGWEHKKSLQILHTFTNSVIAERANEMNANEDCRGDGRGSAPSKNKRR AFLDLLSVTDDEGNRLS
 HEDIREVDTFMFEGHDTTAAAINWSLYLLGSNPEVQKKVDHELDDVFGKSDRPATVEDLKKLRYLECVI
 KETLRLFPSVPLFARSVSEDCEVAGYRVLKGTEAVIIPYALHRDPRIYFPNPEEFQPERFFPENAQGRHPY
 AYVPFSAGPRNCIGQKFVMEEEKTILSCILRHFWEIESNQKREELGLEGLILRPSNGIWKLRNADER

SEQ ID NO: 7 (CYP46A1, NP_006659, 500 aa)

MSPGLLLLGSALLAFGLCCTFVHRARSRYEHIPGPPRPSFLLGHLPCFWKKDEVGGRVLQDVFLDWAKK
 YGPVVRVNVFHKTSVIVTSPESVKKFLMSTKYNKDSKMYRALQTVFGERLFGQGLVSECNYERWHKQRRV
 IDLAFSRSSSLVSLMETFNEKAEQLVEILEAKADGQTPVSMQDMLTYTAMDILAKAAFGMETSMLLGAQKP
 LSQAVKLMLEGITASRNTLAKFLPGKRKQLREVRESIRFLRQVGRDWVQRRREALKRGEVVPADILTQIL
 KAEEGAQDDEGLLDNFVTFFIAGHETSANHLAFTVMELSRQPEIVARLQAEVDEVIGSKRYLDFEDLGR
 QYLSQVLKESLRLYPPAWGTFRLLLEETLIDGVRVPGNTPLLFSTYVMGRMDTYFEDPLTFNPDREFGPGA
 PKPRFTYFPFSLGHRSCIGQQAQMEVKVVMALLQRLERFLVPGQRFGLQEATLKPPLDPVLCITLRPRG
 WQPAPPPPPC

SEQ ID NO: 8 (CYP4A11, NP_000769, 519 aa)

msvsvlspsr llgdvsgilq aaslllillll likavqlylh rgwllkalqg fpcppshwlf
 ghiqelqgdq elqrigkwve tfpsacphwl wggkvrvgly dpdymkvilg rsdpkshgsgy
 rflapwigyg llllngqtwf qhrrmltpaf hydilkpyvg lmadsrvml dkweellgqd
 splevfqhvs lmtldtimkc afshqgsiqv drnsqsyiq a isdlnnlvfs rvrnaafhnd
 tiysltsagr wthracqlah qhtdqviqlr kaqlqkegel ekikrkrhld fldilllakm
 engsilsdkd lraevdtfmf eghdttasgi swilyalath pkhgercree ihsllgdgas
 itwnhldqmp yttmcikeal rlyppvpgig relstpvtfp dgrslpkgim vllsiyglhh
 npkvwpnpev fdpfrfapgs aqhshafllp sggsrncigk qfamnelkva taltllrfel
 lpdptripip iarlvlskn gihlrlrrlp npcedkdql

SEQ ID NO: 9 (CYP4A22, NP_001010969, 519 aa)

msvsvlspsr rlggvsgilq vtslllillll likaaqlylh rgwllkalqg fpcppshwlf
 ghiqefghdq elqrigervk tfpsacpywi wggkvrvgly dpdymkvilg rsdpkshgsgy
 kflaprigyg llllngqtwf qhrrmltpaf hndilkpyvg lmadsrvml dkweellgqd
 splevfqhvs lmtldtimks afshqgsiqv drnsqsyiq a isdlnslvfc cmrnaafhend
 tiysltsagr wthracqlah qhtdqviqlr kaqlqkegel ekikrkrhld fldilllakm
 engsilsdkd lraevdtfmf eghdttasgi swilyalath pkhgercree ihgllgdgas
 itwnhldqmp yttmcikeal rlyppvpgig relstpvtfp dgrslpkgim vllsiyglhh
 npkvwpnlev fdpsrfapgs aqhshafllp sggsrncigk qfamnlkva raltllrfel
 lpdptripip marlvlskn gihlrlrrlp npcedkdql

SEQ ID NO: 10 (CYP4B1, NP_000770, 511 aa)

ES 2 985 828 T3

mvpsflslsf sslglwasgl ilvlglflkli hlllrrqtla kamdkfpgpp thwlfghale
 igetgsldkv vswahqfpya hplwfgqfig flniyepdya kavysrgdpk apdvdydfflq
 wigrllvle gpkwlqhrkl ltpgfhydv kpyvavftes trimldkwee karegksfdi
 fcdvghmaln tlmkctfgrg dtglghrdss yylavsdltl lmqgrlvsfq yhndfiywlt
 phgrrflrac qvahdhtdqv irerkaalqd ekvrkkiqnr rhldfldill gardeddikl
 sdadlraevd tfmfeghdt tsgiswflyc malypehqhr creevreilg dqdffqwddl
 gkmtyltmci kesfrlyppv pqvyrglskp vtfvdgrslp agslismhiy alhrnsavwp
 dpevfdsrlf stenaskrhp fafmpfsagp rncigqqfam semkvvtamc llrfefslp
 srlpikmpql vlrskngfhl hlkplgpgsg k

SEQ ID NO: 11 (CYP4F2, NP_001073, 520 aa)

msqlslswlg lwpvaaspl llllvgaswl lahvlawtya fydnccrlrc fpqpprrnwf
 wghqgmvnpt eegmrvtql vatypqgfkv wmgpispills lchpdiiirsv inasaaiapk
 dkffysflepl wlgdglillsa gdkwsrhrm ltpafhfnil kpymkifnes vnmhakwql
 lasegsacld mfehislmtl dslqkcvfsf dshcgekpse yiaailelsa lvskrhheil
 lhldflyylt pdgqrrrac rlvhdftdav iqerrrtlps qgvddflqak aksktldfid
 vlillskdedg kklssdedira eadtfrmegh dttasglswv lyhlakhpey qercrqevqe
 llkdrepekei ewddlahlpf ltmcmkeslr lhppvpvisr hvtqdivlpld grvipkgiic
 lisvfgthhn pavwpdpevy dpfrfdpeni kersplafip fsagprncig qtfamaemkv
 vlaltllrfr vlpdhteprr kpelvlraeg glwlrvepls

SEQ ID NO: 12 (CYP4F3, NP_000887, 520 aa)

mpqlslsslg lwpmaaspl llllvgaswl larilawtyt fydnccrlrc fpqppkrnwf
 lghlglvhtpt eegllytqsl actfgdmccw wvgpwhaivr ifhptyikpv lfapaaivpk
 dkvfysflkp wlgdglillsa gekwsrhrm ltpafhfnil kpymkifnes vnmhakwql
 lasegsarld mfehislmtl dslqkcvfsf dshcgekpse yiaailelsa lvtkrhqqil
 lyidflyylt pdgqrrrac rlvhdftdav iqerrrtlps qgvddflqak aksktldfid
 vlillskdedg kklssdedira eadtfrmegh dttasglswv lyhlakhpey qercrqevqe
 llkdrepekei ewddlaqlpf ltmckeslr lhppvpavsr cctqdivlpld grvipkgiic
 lisvfgthhn pavwpdpevy dpfrfdpkni kersplafip fsagprncig qafamaemkv
 vlgltllrfr vlpdhteprr kpelvlraeg glwlrvepls

SEQ ID NO: 13 (CYP4F8, NP_009184, 520 aa)

msllslswlg lrpvaaspl llllvgaswl larilawtya fyhngrrlrc fpqprkqnwf
 lghlglvtpt eeglrvltql vatypqgfv wlgpitiin lchpdiiirsv intsdaitdk
 divfyktltp wlgdglillsa gdkwrhrrm ltpafhfnil kpyikifsk animhakwqr
 lamegstold vfehislmtl dslqkcifsf dsncgekpse yitaimelsa lvvkrnnqff
 rykdfllylt pcgrrfhrac rlvhdftdav iqerrrtlts qgvddflqak aksktldfid
 vlillskdedg kelsdedira eadtfrmegh dttasglswv lynlarhpey qercrqevqe
 llkdrepekei ewddlaqlpf ltmclkeslr lhppiptfar gctqdvvlpld srvipkgnvc
 ninifaihnn psvwpdpevy dpfrfdpena qkrspmafip fsagprncig qkfamaemkv
 vlaltllrfr ilpdhreppr tpeivlraed glwlrveplg

SEQ ID NO: 14 (CYP4F11, NP_067010, 524 aa)

mpqlslswlg lgpvaaspl llllvggswl larvlawtyt fydnccrlrc fpqppkqnwf
 wghqglvtpt eegmktltql vttypqgfk wlgptfplli lchpdiiirpi tsasaavapk
 dmifygflkp wlgdglillsa gdkwsrhrm ltpafhfnil kpymkifnks vnmhdkwqr
 lasegsarld mfehislmtl dslqkcvfsf esncgekpse yiaailelsa fvekrnqqil
 lhtdfllylt pdgqrrrac hlvhdftdav iqerrrtlpt qgidflknk aksktldfid
 vlillskdedg kelsdedira eadtfrmegh dttasglswv lyhlakhpey qeqcrqevqe
 llkdrepeiei ewddlaqlpf ltmckeslr lhppvpvisr cctqdvvlpld grvipkgivc
 liniigihyn ptvwpdpevy dpfrfdqeni kersplafip fsagprncig qafamaemkv
 vlaltllhfr ilpthteppr kpelilraeg glwlrveplg ansq

SEQ ID NO: 15 (CYP4F12, NP_076433, 524 aa)

msllslpwlg lrpvatspw1 llllvvgswl larilawtya fynncrrlqc fpqppkrnwf
wghlglitpt eeglknstqm satysqgftv wlgpiipfiv lchpdtirsi tnasaaiapk
dnlfirflkp wlgegillsg gdkwsrhrm ltpafhfnl ksyitifnks animldkwqh
lasegssrld mfehislmtl dslqkcifsf dshcqerpse yiatilelsa lvekrsqhil
qhmdflyyis hdgrrfhrac rlvhdftdav irerrrtlpt qgiddffkdk aksktldfid
vlllskdedg kalsdedira eadtfmfggh dttasqlswv lynlarhpey qercrqevqe
llkdrdpkei ewddlaqlpf ltmcvkeslr lhppapfisr cctqdivlpd grvipkgitc
lidiigvhhn ptvwpdpevy dpfrfdpens kgrsplafip fsagprncig qafamaemkv
vlalmlihfr flpdhteprl klelimraeg glwlrvepln vslq

SEQ ID NO: 16 (CYP4F22, NP_775754, 531 aa)

mlpitdrllh llglektafr iyavstlllf llfflfrlll rflrlcrsfy itcrrlrcfp
qprrrnwllg hlgmylpnea glqdekkvld nmhvvllvwm gpvlp1lllv hpdyikp1lg
asaaiapkdd lfygflkpwl gdgl1l1skgd kwsrhrllt pafhfdilkp ymkifnqsad
imhakwrhla egsavslmfm ehislmtlds lqkcvfsyns ncqekmsdyi saiielsals

vrrqyrlhhy ldfiyyrsad grrfrqacdm vhhftteviq errralrqgg aeawl1kakqg
ktldfidvll lardedgkel sdediraead tfmfeghdt ssgiswmlfn lakypeyqek
creeiqevmk greleelewd dltqlpfttm cikeslrqyp pvtlv1srqct ediklpdgri
ipkgiiclv1s iygthhnptv wpdskvynpy rfdpdpnqqr splayvpfsa gprncigqsf
amaelrvvva ltl1lfr1lsv drtrkvrrkp elilrtengl wlkveplppr a

SEQ ID NO: 17 (CYP4X1, NP_828847, 509 aa)

mefswletrw arpfylafvf clalgl1lqai klylrrqrll rdlrpfppp thwflghqkf
iqddnmekle eiiekypraf pfwigpfqaf fciydpdyak tllsrt1dpks qylqkfsppl
lgkglaaldg pkwfqhrrll tpgfhfnilk ayievmahsv kmml1dkweki cstq1dtsvev
yehinsmsld iimkcafske tncqtnsthd pyakaifels kiifhrlysl lyhsdiifkl
spqgyrfqkl sr1vlnqytdt iigerkkslq agvkdntpk rkyqdfldiv lsakdesgss
fsdidvhsev stfllaghd1t laasiswily clalnpehqe rcreevrgil gdgssitwdq
lgemsyttmc iketcr1lipa vpsisrdlsk pltfpdgctl pagitv1vlsi wglh1hnpavw
knpkvfdplr fsqensdqrh pyaylpfsag srncigqefa mielkv1tial illhfrvtpd
ptrpltfpnh filkpkn1gmy lhlkklsec

SEQ ID NO: 18 (CYP4Z1, NP_835235, 505 aa)

mepswlqelm ahpfl1l1l1 cmsl1l1fqvi rlyqrrrrwmi ralhlfpapp ahwfyghkef
ypvkefevyh klmekypcav plwvgpftmf fsvhd1pdyak illkrqdpks avshkilesw
vgrglvtldg skwkkhrqiv kpgfnisilk ifitmm1sesv rmm1lnkweeh iaqnsr1elf
qhvs1mtlds imkcafshqg siqldstlds ylkavfnlsk isnqrmn1fl hhndlvfkfs
sqqqifskfn qelhqftek1v iqdrkeslkd klkqdt1tqkr rwdfldills aksentkdfs
eadlqaevkt fmfaghd1ts sa1swilycl akypehqgrc rdeirellgd gssitwehls
qmpyttmcik eclrlyapv1v nisr1ldkpi tfpdgrslpa gitv1finiwa lhhnpyfwd
pqvfnpl1rfs rensekihpy afipfsaglr ncigqhfaii eckvavalt1 lrfklapdhs
rppqpvrqv1v lkskngihvf akkv1c

SEQ ID NO: 19 (isoforma X1 del citocromo P450 4V2 [chimpancé *Pan troglodytes*]), XP_001165629.1, 525 aa)

maglwlg1vw qkll1l1gaas avslagaslv ls1l1qrvaty arkwqgm1rpi ptvarayplv
ghallmkpdg reffq1q1iey teeyrhmp1l klwvgpvpmv alynaenvev iltsskq1dk
ssmykflep1w lg1gl1ltstg nkwsr1rkml tptfhftile dfldimnega ntlvkklekh
inqeafncff yitlcaldi1 cetamgknig aqsnddseyv ravymsemi frrikmp1lw
ldlwylmfke gw1hkkslki lhtftnsvia eranem1nane dcrgdgrgsa psknkrrafl
d1l1svtdde gnrlshedir eevdt1mfeg hdttaaainw slyllgsnpe vqkkvdheld
dvfgksdrpa tvedlkk1ry lecviket1r lfpsvp1lfar svsedcevag yrv1kgteav
iipyalhrdp ryf1pnpeefq perffpknaq grhpyayvpf sagprncig1q kfavmeekti
lscllrhfw1 esnqkreelg legql1l1rps ngiwi1klrr nader

SEQ ID NO: 20 (citocromo P450 4V2 [*Macaca mulatta* (macaco de la India)], NP_001180767.1, 525 aa)

magiwlglvw qklllwgaas avslagaslv lsllqrvasy vrkwqgmрпи ptvarayplv
ghallmkrdrq reffqqiiey teeyrhmpll klwvqpvpmv alynaenvev iltsskqidk
ssmykflepwl lglglltstg nkwrssrkml tptfhftile dfldimnega nilvkklekh
vngeafncfv yitlcaldii cetamgknig aqsnddseyv ravymsemi frrikmpwlw
ldlwylmfke gwehkkslki lhaftnnvia eranemnvde dcrgdgrdsa psknkrfl
dlllsvtdde gnrlshedir eevdtfmfeg hdttaaamnw slyllgsnpe vqkkvdheld
dvfgrsdrpa tvedlkklyr lecviketlr lfpsvplfar svsedcevag yrvlkgteav
iipyalhrdp ryfnppeefr perffpenaq grhpyayvpf sagprncigq kfavmeekti
lscllrhfwl esnqkreelg legqlilrpt ngiwiklkr nadep

SEQ ID NO: 21 (citocromo P450 4V2 [*Canis lupus familiaris* (perro)], XP 013975571.1, 539 aa)

mlkvkwkenv fregdkdsnm ldavqlpsik vesalsdaea ggspggrrpv ltvergrlaq
gsmssllknp kdttrnsliki kyflpeffqk vilyseesrh lp1lklwlgp ipivaiysae
nveviltssr qidksyvykf lepwlglgll tstgnkwsr rkmltptfhf tiledfldvm
nehanilvnl lekhnveaf nccffiytlca ldiicetamg knigaqnned seyvrariym
sdthrrmkm pwlwldflfl mfkegrehr nleilhnftn nviterasel krdeehgsad
kdcspsknr rafldlllnv tddegknlrh edvreevdtf mfeghdttaa ainwslyllg
syvevqkgvd seledvfgks drpatledlk klkylecvik eslrlfsvp lfarnlnedc
vvagykvvkg sqaiiipyal hrdpryfpnp eefqperffp enlqgrhpya yipfsagprn
cigqrfaime ektvlscvrl hfwvesnqkr eelglageli lrptngiwik lkrnades

SEQ ID NO: 22 (citocromo P450 4V2 [*Bos taurus* (vaca)], NP_001029545, 527 aa)

mlapwllsvg pkl1lwsglc avslagatlt lnllkmvasy arkwrqmrpv ptigdpyp1v
ghalmmkpda rdffqqi1df teecrhlp1l klwlgpvplv alynaetvev ilssskhiek
symykfllepwl lglglltstg nkwrssrkml tptfhftile dfldvmnega nilvttlekh
vngeafncff yvtlctldii cetamgknig agrnddseyv ravymssdi hqrmkmpwlw
ldlifymfkn grehrrslki vhdftnnvit eranemkrhe egtsndkekd fpprktkcra
fldlllnvtd dqgnklshed ireevdtfmf eghdttaaai nwslyllgwy pevqqrvtde
leevfgksdr pvtledlkk1 kyldcvikes lrlfsvpff arnltdcev aghkivggcq
viivpyalhr dpkyfpdpee fkperffpen lkgrhtyayv pfsagprnci gqkfameek
tilscilrhf wvesnqkree lglagelilr psngiwiklkr rntdes

SEQ ID NO: 23 (Cyp4v3, citocromo P450 4V2 [*Mus musculus* (ratón doméstico)], NP_598730.1, 525 aa)

mlwlwlglsq qklllwgaas avslagatlt isifpmlvsy arkwqgmrsi psvarayplv
ghalymkpnn aeffqqliyy teefrhlp1l klwigpvplv alykaenvev iltsskqidk
sflykflqpwl lglglltstg skwrtrrkml tptfhftile nfldvmnega nilvtnlekh
vngeafncff yitlcaldii cetamgknig aqsnddseyv rtvyrmsdmi yrrmknmpwlw
fdlwylvfke grdhkrglk lhtftnnvia ervkerkaee dwtgagrgpi psknkrkaf1
d111svtdee gnrlsqedir eevdtfmfeg hdttaaainw slyllgt1pe vqrkvdgeld
evfgrshrpp tledlkk1ky ldcviketlr vfpsvplfar slsedcevag ykvtkgteai
iipyalhrdp ryfpdpeefr perffpensq grhpyayvpf sagprncigq kfavmeekti
lacilrqfwv esnqkreelg lagdlilrpn ngiwiklkr heddp

SEQ ID NO: 24 (Cyp4v3, citocromo P450 4V2 [*Rattus norvegicus* (rata parda)], NP 001129072, 525 aa)

mlwlwlglsq qklllwgaas avsvagatvl ln1lqmlvsy arkwqgmрпи psvarayplv
ghalfmkpnn teffqqiiqy teefrhlp1l klwigpvplv alykaenvev iltsskqidk
sfmykflqpwl lglglltstg skwrarrkml tpsfhftile dfldvmnega nilvtnlekh
vngeafncff pitlcaldii cetamgknig aqsngdseyv rtvyrmsdmi yrrmknmpfw
fdlwylmfke grdhkkg1ks lhtftnnvia ervnarkaeq dcigagrgpl psktkrkaf1
d111svtdee gnklshedir eevdtfmfeg hdttaaainw slyllgsnpe vqrkvdkeld
dvfgrshrpp tledlkk1ky ldcviketlr vfpsvplfar slsedcevag ykiskgteav
iipyalhrdp ryfpdpeefq perffpensq grhpyayvpf sagprncigq kfavmeekti
lacilrefwi esnqkreelg lagdlilrpn ngiwiklkr heddp

SEQ ID NO: 25 (citocromo P450 4V2 [*Gallus gallus* (pollo)], NP 001001879, 530 aa)

mameitlgsm egtqllpwva gait1lltvv tvhflps1ln ywwwvwmkp ipgirpcypf
vgnal1lern gegffkqlqg yadefrkmpm fklwlgplpv tvlfhpdsvv vilssskhik
ksflytflhp wlg1glltst gdkwrssrkml itptfhfail ndflevmneq ggvlleklek

ES 2 985 828 T3

```

hvdkepfniif tditlcaldi icetamgknl gaqdnkdsey vravyrmsdl iqqrqkspwl
whdlmyllfk egrehernlk ilhgftdtvi aekvaalent kltkhdttdvn teeessgskkr
eafldmllna tddegkklly kdireevdtf mfeghdttaa amnwvlyllg hhpeaqkkvh
qeldevfgnt erpvtvddlk klrylecvvk ealrlfpsvp mfarslqedc yisgyklpkg
tnvlvlttyvl hrdpeifpep defrperffp enskgrhpya yvpfsagprn cigqrfaqme
ektllalilr rfwvdcsqkp eelglsgeli lrpnnngiwvq lkrprktvte

```

5 SEQ ID NO: 26 (miembro 2 de la subfamilia V de la familia 4 del citocromo P450 [*Xenopus tropicalis* (sapo acuático tropical)], NP_001072667.1, 523 aa)

```

melggevhll vwvaavvll tllalsilpa lqdyvrkrri lkpipggpgpn ypligdalfl
knnggdfflq iceytesyrl qpllkvwigt ipfivvyhad tvepvlsssk hmdkaflykf
lhpwlkgkll tstgekwsr rkmitptfhf ailseflevm neqskilvek lqthvdgesf
dcfmdvtlca ldiisetamg rkiqaqsnrd seyvgaiykm sdiqrrqkm pwlwldflya
hlrdgkehdk nlkilhsftd kaileraeel kkmgeqkkeh cdsdpesdkp kkrasfldml
lmatddagkn msymdireev dtfmfeghdt taaalnswlf llgshpeaqr qvhkeldevf
gksdrpvtmd dlkklylea vikeslriyp svplfgrvt edcsirgfhv pkgvnvviip
yalhrdpeyf pepeefrper ffpnasgrn pyayipfsag lncigqrfa lmeekvvlss
ilrnywveas qkreelcllg elilrpqdgw wiklknreta pta

```

10 SEQ ID NO: 27 (citocromo P450 4V2 [*Equus caballus* (caballo)], XP_014592182.1, 469 aa)

```

mfvliefkik yslsdfqql iyyteenrhl plklwlgpv pvvifynaen veviltssrq
idksymyfl kpwlgllt stgnkwsrr kmltptfhft nledfldvmn eganilvnlk
ekhvneafn cflyitlcal diicetamg nigaqrnds eyvravyrms dmihrrmkmp
wlwldiffm fkegrehrrl lkilhnftnn viverasemk kdeersrdd ggsapsknkr
rafldlllnv tddegkklsh edirgevdft mfeghdttaa ainwslyllg cypevqkkvd
seleevfgks drpatledlk klkylecvmk etlrlfpsvp lfarnlnedc evagykiavk
sqaiivsyal hrdsryfnp eefkperffp ensqgrhpya yvpfsagprn cigqkfavme
ekiilscilr hfwvesnqkr eelglageli lrpnsngiwik lkrntees

```

SEQ ID NO: 28 (citocromo P450 4V2 [*Oryctolagus cuniculus* (conejo)], XP_002709379.1, 524 aa)

```

mwllwlglvqg kllfwgaasa vslagasfl nllqmvasya rkwwqmrpip tigrpyplvg
halmkpsqk effqqliqyt eeyrhlpilk lwlgplpiva lynaenvevi lnsqkqinks
smqflepwl glglststgy kwrsrrkmlt ptfhftiled fldimneqan ilvhklekhv
dqeafncffy itlcaldiic etamgkniga qsnedseyvr avyrmsdvif rrmkmpwlwl
dlwylmfkeg wehkrclkil hrftnnviae rvsemktdee hrdadsncap stmkrkafl
llltvtdeeg nklsheidre evdtfmfegh dttaaaainws lyllgshpev qrvkddele
vfgksdrpat sedlklkyl ecviketlrl fpsvplfars lsddcevagf rvvkgqtqavi
vpyalhrdpk yfpnppefrp erffpenaqq rhyayvpfs agprncigqk faimeektil
15 scilrklwve snqkmeelgl agelilrptn giwiklkrn adka

```

SEQ ID: 29 (citocromo P450-4c3 [*Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta)], NP_524598, 535 aa)

```

msskvitslm aesillskvg qvisgyspit vlllgslif lvvynkrssr lvkyiekipg
paampflgna iemnvhdhel fnrvigmqkl wgtriginrv wqgtaprll fepetvepil
nsqkfvnksh dydylhpwlg eglltstdrk whsrrkilt afhfkilddf idvfneqsav
larklavevg seafnlfpv tlctldivce tamgrriyaq snseseyvka vygigsivqs
rqakiwlqsd fifsltaeyk lhqsyintlh gfsnmvire kaelailqen nnnnnnnnapd
ayddvgkkkr lafldllida skegtvlsne direevdtfm feghdttsaa iswtlfllgc
hpeyqervve eldsifgddk etpatmknm dmryleccik dslrlfpsvp mmarmvgedv
niggkivpag tqaiimtyal hrnprvfpkp eqfnpdnflp encagrhpfa yipfsagprn
20 cigqkfaile ekavistvtr kykieavdr edltllgeli lrpkdglrvk itprd

```

SEQ ID NO: 30 (elemento distintivo de P450, "x" indica cualquier aminoácido) FxxGxxxCxG

SEQ ID NO: 31 (elemento distintivo de P450, "x" indica cualquier aminoácido) ExxR

25 SEQ ID NO: 32 (promotor CAG, 1715 pb)

GACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGA
 GTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACG
 TCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATT
 TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAA
 TGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTAC
 ATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTGAGGTGAGCCCCACGTCTGCTTCACTCTCCCCATC
 TCCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGACGCGATGGGGCGG
 GGGGGGGGGGGCGCGCGCCAGGCGGGCGGGGCGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTG
 CGCGCGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGCGGCGGCGG
 CTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGTGCCTGCGTTGCTTCGCCCCGTGCCCGCTCCGCGCC
 GCCTCGCGCGCGCGCGCGCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTT
 CTCTCCGGGCTGTAAATTAGCGCTTGGTTTAAATGACGGCTCGTTTCTTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCT
 TAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGTGCGT
 GGGGAGCGCGCGTGCAGCGCGCGCTGCCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGCGGGGCTTTGTG
 CGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGA
 ACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGGCGGTGCGGCTGT
 ACCCCCCCTGCACCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTGCGGG
 GCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCGG
 CCTCGGGCGGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCGCGGCGGCTGTGAGGCGCGGC
 GAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCTTTGTCCCAAATCTGG
 CGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCGCGCACCCCTCTAGCGGGCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGC
 AGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCTTCTGTGCGTGCCTGCGCGCGCGCTCCCTTCTCCATCTCCAGCCTC
 GGGCTGCCCGAGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTG
 ACCGGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAACG
 TGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATCATTTTGGCAA

SEQ ID NO: 33 (potenciador WPRE, 589 pb)

AATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGC
 TATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTTCAATTTCTCCTC
 CTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTG
 TGCATGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGAGCTCCTTTCCGGGA
 CTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCATCGCCGCTGCCTTCCCCGCTGCTGGACAGG
 GGCTCGGCTTTGGGCACTGACAAATTCGTGGTGTGTCGGGGAATCATCGTCCCTTTCTTGGCTGCTC
 GCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGG
 ACCTTCCTTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTCTGCGGCTCTTCCGCGTCTTCGCTTCGCCCTCAGACGAG
 TCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCCGC

SEQ ID NO: 34 (poliA de bGH, 225 pb)

CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGC
 CACTCCCACTGTCTTTTCTTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATT
 CTGGGGGTGGGTGGGCGAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATG
 CGGTGGGCTCTATGG

SEQ ID NO: 35 (promotor EFS, 235 pb)

g attggctccg gtgcccgtca gtgggcagag cgcacatcgc ccacagtccc cgagaagttg
 gggggagggg tcggcaattg aaccgggtgcc tagagaaggt ggcgcggggg aaactgggaa
 agtgaatgctg tgtactggct ccgccttttt cccgaggggtg ggggagaacc gtatataagt
 gcagtagtgc ccgtgaacgt tctttttcgc aacgggtttg ccgccagaac acag

SEQ ID NO: 36 (SPA, 54 pb)

GATCCAATAAAAAGATCTTTATTTTCATTAGATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTG

SEQ ID NO: 37 (secuencia Kozak, 6 pb)
 GCCACC

SEQ ID NO: 38 (secuencia Kozak, 5 pb)
 CCACC

SEQ ID NO: 39 (PoliA tardía de SV40, 120 pb)

TTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCATT
TTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTAT

SEQ ID NO: 40 (promotor CMV, 576 pb)

TAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAAATTACGGTAA
ATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT
AACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA
CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATT
ATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTAC
CATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGAATCACGGGGATTTCCTAAGT
CTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTCTGA
ACAACCTCCGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGG
TTTAGTGAACCGTCAG

5

SEQ ID NO: 41 (promotor EF-1 alfa, 1184 pb)

cgtgaggctccgggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttggggggagg
ggtcggaattgaaccgggtgcttagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgctggtactgg
ctccgcctttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttc
gcaacgggtttgcccgcagaacacaggttaagtgcctggtgtgtgttcccgcgggcctggcctctttacggg
ttatggcccttgcggtgcttgaattacttccacctggcgtgcagtagctgattcttgatcccgagcttcgg
gttggaagtgggtgggagagttcgaggccttgcgcttaaggagcccccttcgcctcgtgcttgagttgagg
cctggcctgggcgctggggcgccgctgcgaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgtgcttttoga
taagtctctagccattttaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttttctggcaagatagctcttgta
aatgcggggccaagatctgcacactggtatttcgggtttttggggcgcgggcgcgacggggcccggtgct
cccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccgagaatcgagcgggggtagctctca
agctggcgcgccctgctctggtgcttgccctgcgcgcgcctgtatcgcccgccttgggcggaaggctg
gcccggctggcaccagttgctgagcggaaagatggcgcttcgccgcctgctgcagggagctcaaat
ggaggacgcggcgctcgggagagcggcggggtgagtcacccacacaaaggaaaaggcctttccgtcctc
agcgtcgcttcctgctgactccacggagtagcggcgccgctccaggcacctcgattagttctcgagcttt
tggagtacgtcgtcttttaggttgggggaggggttttatgcatggagtttccccacactgagtggggtgg
agactgaagtttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttgatc
ttggttcattctcaagcctcagacagtggttcaaagttttttcttccatttcagggtgctgta

10

SEQ ID NO: 42 (ITR izquierda 5' de AAV2, 141 pb)

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccggggcgtc
ggcgacatt tggcgccc gctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca
actccatcac taggggttc t

15

SEQ ID NO: 43 (ITR derecha 3' de AAV2, 141 pb)

ag gaaccctag tgatggagtt ggccaactccc tctctgcgcg ctcgctcgt cactgaggcc
ggcgaccaa aggtcgccc acgcccgggc tttgccggg cgccctcagt gagcgagcga
gcgcgcagct gctgcagg

20

SEQ ID NO: 44 (ITR 5' de AAV2 mutante en construcción de scAAV, 117 pb)

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccggggcgtc
ggcgacatt tggcgccc gctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtgg

25

SEQ ID NO: 45 (ITR 3' de AAV2 en construcción de scAAV, 141 pb)

aggaaccc ctatgtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgt cgctcactga
ggcgggcgga ccaaaggctg ccgagccc gggttttgc cggcgggcct cagtgagega
gcgagcgcg agctgcctgc agg

30

SEQ ID NO: 46 (región del gen CYP4V2 humano que contiene la mutación c.802-8_810del17insGC)
CAAACAGAAGCATGTGATTATCATTCAAAGCGAACGGGCCAATGAAATGAACGCCAATGA

SEQ ID NO: 47 (región del gen CYP4V2 humano de tipo silvestre sin la mutación c.802-8_810del17insGC)

CAAACAGAAGCATGTGATTATCATTTCAAATCATAACAGGTCATCGCTGAACGGGCCAATGAAATGAACGCC
AATGA

SEQ ID NO: 48 (elemento protoespaciador g1, Secuencia de ARN, 20 nt)
UGAUUAUCAUCAAAGCGAA

SEQ ID NO: 49 (elemento protoespaciador g2, Secuencia de ARN, 20 nt)
GAUUAUCAUCAAAGCGAAC

SEQ ID NO: 50 (elemento protoespaciador g3, Secuencia de ARN, 20 nt)
GAUAAUCACAUGCUUCUGUU

SEQ ID NO: 51 (elemento protoespaciador g4, Secuencia de ARN, 20 nt)
UUCAUUGGCGUUCAUUUCAU

SEQ ID NO: 52 (elemento protoespaciador g5, Secuencia de ARN, 20 nt)
CACAUUGCUUCUGUUUGGACU

SEQ ID NO: 53 (secuencia de ejemplo de ARNcr (excluyendo la secuencia del elemento protoespaciador 5' y
16 nt)
GUUUUAGAGCUAUGCU

SEQ ID NO: 54 (secuencia de ejemplo de ARNtracr, 67 nt)
AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUU

SEQ ID NO: 55 (secuencia de ejemplo de ARNgu, excluyendo la secuencia del elemento protoespaciador 5' y
el "G" opcional antes del elemento protoespaciador. Secuencia mostrada en formato de ADN como en una
construcción de plásmido. Para la secuencia en formato de ARN, usar "U" para reemplazar "T", 82 nt)

gttttagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtcggttatcaacttgaaaaagtggcaccgagt
cgtgtcgtttttt

SEQ ID NO: 56 (secuencia de molde donante 1 de CYP4V2, 200 bases)

AGA AAA ATA AAT GAA AGA AAC TAG CAT ATT TTA TAA GAA AAT GTG TTA ACT
AGG GTG CAT CCA AGT CCA AAC AGA AGC ATG TGA TTA TCA TTC AAA TCA TAC
AGG TCA TCG CTG AAC GGG CCA ATG AAA TGA ACG CCA ATG AAG ACT GTA GAG
GTG ATG GCA GGG GCT CTG CCC CCT CCA AAA ATA AAC GCA GGG CCT TT

SEQ ID NO: 57 (secuencia de molde donante 2 de CYP4V2, el complemento inverso de la secuencia de molde
donante 1 de CYP4V2, 200 bases)

AA AGG CCC TGC GTT TAT TTT TGG AGG GGG CAG AGC CCC TGC CAT CAC CTC TAC
AGT CTT CAT TGG CGT TCA TTT CAT TGG CCC GTT CAG CGA TGA CCT GTA TGA
TTT GAA TGA TAA TCA CAT GCT TCT GTT TGG ACT TGG ATG CAC CCT AGT TAA
CAC ATT TTC TTA TAA AAT ATG CTA GTT TCT TTC ATT TAT TTT TCT

SEQ ID NO: 58 (secuencia de aminoácidos de ejemplo de SpCas9 (1368 aa))

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARR
 RYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRK
 KLVQSTDKADLRILIYLAHAMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFTIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKA
 ILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLA
 QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEI
 FFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELH
 AILRRQEDFYPPFLKDNREKIEKILTFRIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVVDKGASQS
 FIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVT
 VKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTTLTLFEDRE
 MIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDQSGKTILDFLKSDGFANRNFMLIHDD
 SLTFKEDIQKAQVSGQDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEARENQTT
 QKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVBH
 IVPQSFLKDDSIDNKVLTNRSDKNRGKSDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGGLSE
 LDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKVRINN
 YHHAHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEI GKATAKYFFYSNIMNFFKTEI
 TLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLI
 ARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAVKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEV
 KKDILIKLPKYSLEFELNGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVE
 QHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKH RDKPIREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTT
 IDRKYTSTKEVLDATLIHQ SITGLYETRIDLSQLGGD

SEQ ID NO: 59 (nucleótido adicional insertado inmediatamente después de la secuencia del promotor U6 y antes de la secuencia del elemento protoespaciador en una construcción de plásmido y en un ARN_g de IVT, 1 nt) G

SEQ ID NO: 60 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op y AAV5.CYP4V2op.:

ITR-Izquierda: 1-141
 Promotor CAG: 237-1951
 ADNc de CYP4V2op: 2002-3579
 Potenciador WPRE: 3736-4324
 poliA de bGH: 4350-4574
 ITR-Derecha 4659-4799

1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
 51 CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
 101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTC TCGCGCCAAT
 151 TCAGTCGATA ACTATAACGG TCCTAAGGTA GCGATTAAAA TACGCGCTCT
 201 CTTAAGGTAG CCCCAGGACG CGTCAATTGA GATCTCGACA TTGATTATTG

251 ACTAGTTATT AATAGTAATC AATTACGGGG TCATTAGTTC ATAGCCCATATA
 301 TATGGAGTTC CGCGTTACAT AACTTACGGT AAATGGCCCCG CCTGGCTGAC
 351 CGCCCAACGA CCCCCGCCCA TTGACGTCAA TAATGACGTA TGTTCACATA
 401 GTAACGCCAA TAGGGACTTT CCATTGACGT CAATGGGTGG ACTATTTACG
 451 GTAAACTGCC CACTTGGCAG TACATCAAGT GTATCATATG CCAAGTACGC
 501 CCCCTATTGA CGTCAATGAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCA TTATGCCCAG
 551 TACATGACCT TATGGGACTT TCCTACTTGG CAGTACATCT ACGTATTAGT
 601 CATCGCTATT ACCATGGGTC GAGGTGAGCC CCACGTTCTG CTCACCTCTC
 651 CCCATCTCCC CCCCCTCCCC ACCCCCAATT TTGTATTTAT TTATTTTTTA
 701 ATTATTTTGT GCAGCGATGG GGGCGGGGGG GGGGGGGGCG CGCGCCAGGC
 751 GGGGCGGGGC GGGGCGAGGG GCGGGGCGGG GCGAGGCGGA GAGGTGCGGC
 801 GGCAGCCAAT CAGAGCGGCG CGCTCCGAAA GTTTCCTTTT ATGGCGAGGC
 851 GCGGCGGGCG GCGGCCCTAT AAAAAGCGAA GCGCGCGGCG GCGGGGAGTC
 901 GCTGCGTTGC CTTGCCCCCG TGCCCCGCTC CGCGCCGCCT CGCGCCGCCC
 951 GCCCCGGCTC TGACTGACCG CGTTACTCCC ACAGGTGAGC GGGCGGGACG
 1001 GCCCTTCTCC TCCGGGCTGT AATTAGCGCT TGGTTTAATG ACGGCTCGTT
 1051 TCTTTTCTGT GGCTGCGTGA AAGCCTTAAA GGGCTCCGGG AGGGCCCTTT
 1101 GTGCGGGGGG GAGCGGCTCG GGGGCTGCGT GCGTGTGTGT GTGCGTGGGG
 1151 AGCGCCGCGT GCGGCCCGCG CTGCCCCGCG GCTGTGAGCG CTGCGGGGCG
 1201 GGCGCGGGGC TTTGTGCGCT CCGCGTGTGC GCGAGGGGAG CGCGGCCGGG
 1251 GGCGGTGCCC CGCGGTGCGG GGGGGCTGCG AGGGGAACAA AGGCTGCGTG
 1301 GGGGCTGTGT GCGTGGGGGG GTGACGAGGG GGTGTGGGCG CGGCGGTGCG
 1351 GCTGTAACCC CCCCCTGCAC CCCCCTCCCC GAGTTGCTGA GCACGGCCCCG
 1401 GCTTCGGGTG CGGGGCTCCG TCGGGGGCGT GCGCGGGGGC TCGCCGTGCC
 1451 GGGCGGGGGG TGGCGGCAGG TGGGGGTGCC GGGCGGGGCG GGGCCGCCTC
 1501 GGGCCGGGGA GGGCTCGGGG GAGGGGCGCG GCGGCCCGGG AGCGCCGGCG
 1551 GCTGTCGAGG CGCGGCGAGC CGCAGCCATT GCCTTTTATG GTAATCGTGC
 1601 GAGAGGGCGC AGGGACTTCC TTTGTCCCAA ATCTGGCGGA GCCGAAATCT
 1651 GGCAGGCGCC GCCGCACCCC CTCTAGCGGG CGCGGGCGAA GCGGTGCGGC
 1701 GCCGGCAGGA AGGAAATGGG CGGGGAGGGC CTTCTGTGCGT CGCCGCGCCG
 1751 CCGTCCCCTT CTCCATCTCC AGCCTCGGGG CTGCCGCGAG GGGACGGCTG
 1801 CCTTCGGGGG GGACGGGGCA GGGCGGGGTT CGGCTTCTGG CGTGTGACCG
 1851 GCGGCTCTAG AGCCTCTGCT AACCATGTTT ATGCCTTCTT CTTTTTCCCTA
 1901 CAGCTCCTGG GCAACGTGCT GGTATTGTG CTGTCTCATC ATTTTGGCAA
 1951 AGAATTCTAA TACGACTCAC TATAGGGAGA CCAAGCTGG CTAGAGCCAC
 2001 CATGGCTGGA CTGTGGCTGG GACTGGTGTG GCAGAACTG CTGCTGTGGG
 2051 GGGCCGCTTC CGCACTGTCA CTGGCTGGGG CTTCACTGGT GCTGAGCCTG
 2101 CTGCAGAGGG TGGCCTCCTA CGCCAGAAAG TGGCAGCAGA TGAGGCCCAT
 2151 CCCTACCGTG GCCAGAGCCT ATCCACTGGT GGGACACGCA CTGCTGATGA
 2201 AGCCTGACGG CAGAGAGTTC TTTCAGCAGA TCATCGAGTA CACAGAGGAG
 2251 TATAGGCACA TGCCACTGCT GAAGCTGTGG GTGGGACCCG TGCCATAGGT
 2301 GGCCCTGTAC AACGCCGAGA ATGTGGAAGT GATCCTGACC AGCAGCAAGC
 2351 AGATCGATAA GTCTAGCATG TATAAGTTCC TGGAGCCTTG GCTGGGCCTG
 2401 GGCTGTGCTA CCTCTACAGG CAACAAGTGG AGGAGCCGGA GAAAGATGCT
 2451 GACCCCAACA TTCCACTTTA CAATCCTGGA GGAATTCCTG GACATCATGA
 2501 ACGAGCAGGC CAATATCCTG GTGAAGAAGC TGGAGAAGCA CATCAACCAG
 2551 GAGGCCTTTA ATTGCTTCTT TTACATCACC CTGTGCGCCC TGGACATCAT
 2601 CTGTGAGACA GCTATGGGCA AGAACATCGG CGCCCAGTCT AATGACGATA
 2651 GCGAGTACGT GCGGGCCGTG TATAGAATGA GCGAGATGAT CTTTAGGCGC
 2701 ATCAAGATGC CCTGGCTGTG GCTGCATCTG TGGTATCTGA TGTTCAGGA
 2751 GGGCTGGGAG CACAAGAAGT CCCTGCAGAT CCTGCACACC TTTACAAACT
 2801 CTGTGATCGC CGAGAGAGCC AATGAGATGA ACGCCAATGA GGAAGTATAGG
 2851 GGCGATGGAA GGGGCAGCGC CCCTTCCAAG AACAAGCGGA GAGCCTTCCT

ES 2 985 828 T3

```

2901 GGACCTGCTG CTGAGCGTGA CCGACGATGA GGGCAATCGC CTGTCCCACG
2951 AGGACATCCG GGAGGAGGTG GATACATTCA TGTTTGAGGG ACACGACACC
3001 ACAGCCGCCG CCATCAACTG GTCCCTGTAC CTGCTGGGCT CTAATCCAGA
3051 GGTGCAGAAG AAGGTGGATC ACGAGCTGGA CGACGTGTTT GGCAAGTCCG
3101 ACAGGCCAGC AACCCTGGAG GATCTGAAGA AGCTGAGATA CCTGGAGTGC
3151 GTGATCAAGG AGACACTGCG CCTGTTCCTC TCTGTGCCCT TGTTCGCCCG
3201 GTCCGTGTCT GAGGACTGTG AGGTGGCCGG CTATCGCGTG CTGAAGGGCA
3251 CCGAGGCCGT GATCATCCCT TACGCCCTGC ACCGGGACCC CAGGTATTTT
3301 CCTAACCAG AGGAGTTTCA GCCAGAGAGA TTCTTTCCCG AGAATGCCCA
3351 GGGCAGGCAC CCTTACGCCT ATGTGCCATT CTCCGCCGGA CCAAGGAACT
3401 GCATCGGACA GAAGTTTGCC GTGATGGAGG AGAAAACCAT CCTGTCTTGT
3451 ATCCTGAGAC ACTTCTGGAT CGAGAGCAAT CAGAAGAGGG AGGAGCTGGG
3501 CCTGGAGGGA CAGCTGATCC TCGGCCAAG CAACGGCATC TGGATCAAAC
3551 TGAAAAGAAG GAACGCTGAC GAGAGGTAAA AGCTTGGTAC CGATATCGCG
3601 GCCGCCCTAG GGAGCTCCTC GAGGCGGCC GCTCGAGTCT AGAGGGCCCT
3651 TCGAAGGTAA GCCTATCCCT AACCCTCTCC TCGGTCTCGA TTCTACGCGT
3701 ACCGGTCATC ATCACCATCA CCATTGAGTT TCGATAATCA ACCTCTGGAT
3751 TACAAAATTT GTGAAAGATT GACTGGTATT CTTAACTATG TTGCTCCTTT
3801 TACGCTATGT GGATACGCTG CTTTAATGCC TTTGTATCAT GCTATTGCTT
3851 CCCGTATGGC TTTCATTTTC TCCTCCTTGT ATAAATCCTG GTTGCTGTCT
3901 CTTTATGAGG AGTTGTGGCC CGTTGTCAGG CAACGTGGCG TGGTGTGCAC
3951 TGTGTTTGCT GACGCAACCC CCACTGGTTG GGGCATTGCC ACCACCTGTC
4001 AGCTCCTTTC CGGGACTTTC GCTTTCCCCC TCCCTATTGC CACGGCGGAA
4051 CTCATCGCCG CCTGCCTTGC CCGCTGCTGG ACAGGGGCTC GGCTGTTGGG
4101 CACTGACAAT TCCGTGGTGT TGTCGGGGAA ATCATCGTCC TTTCTTGGC
4151 TGCTCGCCTG TGTTGCCACC TGGATTCTGC GCGGGACGTC CTTCTGCTAC
4201 GTCCCTTCGG CCCTCAATCC AGCGACCTT CCTTCCCGCG GCCTGCTGCC
4251 GGCTCTGCGG CCTCTTCCGC GTCTTCGCTC TCGCCCTCAG ACGAGTCGGA
4301 TCTCCCTTTG GGCCGCTCC CCGCATCGAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC
4351 TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC CATCTGTTGT TTGCCCCCTC CCCGTGCCTT
4401 CCTTGACCCT GGAAGGTGCC ACTCCCACTG TCCTTTCCCTA ATAAAATGAG
4451 GAAATTGCAT CGCATTGTCT GAGTAGGTGT CATTCTATTC TGGGGGGTGG
4501 GGTGGGGCAG GACAGCAAGG GGGAGGATTG GGAAGACAAT AGCAGGCATG
4551 CTGGGGATGC GGTGGGCTCT ATGGCTTCTG AGGCGGAAAG AACCAGATCC
4601 TCTCTTAAGG TAGCATCGAG ATTTAAATTA GGGATAACAG GGTAAATGGC
4651 CGGGCCGCAG GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG
4701 CTCGCTCGCT CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTCGCCCC ACGCCCGGGC
4751 TTTGCCCCGG CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

```

SEQ ID NO: 61 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en AAV5.CYP4V2st. AAV5.CYP4V2st tiene el mismo promotor (CAG), potenciador (WPRE) y poliA (poliA-bGH) que AAV2.CYP4V2op, AAV2tri(Y-F).CYP4V2op y AAV5.CYP4V2op (SEQ ID NO: 60) pero secuencias de ADNc y unión/enlazador de CYP4V2 diferentes:

ITR-Izquierda: 1-141

Promotor CAG: 166-1880

ADNc de CYP4V2st: 1938-3515

Potenciador WPRE: 3551-4139

poliA de bGH: 4163-4387

ITR-Derecha: 4399-4539

```

1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
51 CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC

```

ES 2 985 828 T3

```

101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTC TCGGGCCTAA
151 GGCAATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA
201 ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA
251 ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCCGCCCAT
301 TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC
351 CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTGGCAGT
401 ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACG
451 GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT
501 CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTCC
551 AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTCACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCCA
601 CCCCCAATTT TGTATTTATT TATTTTTTAA TTATTTTGTG CAGCGATGGG
651 GCGGGGGGGG GGGGGGGCGC GCGCCAGGCG GGGCGGGGCG GGGCGAGGGG
701 CGGGGCGGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGCGC
751 GCTCCGAAAG TTTCCTTTTA TGGCGAGGCG GCGGCGGGCG CGGCCCTATA
801 AAAAGCGAAG CGCGCGGCGG GCGGGAGTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCCGT
851 GCCCCGCTCC GCGCCGCCCTC GCGCCGCCCG CCCCGGCTCT GACTGACCGC
901 GTTACTCCCA CAGGTGAGCG GCGGGGACGG CCCTTCTCCT CCGGGCTGTA
951 ATTAGCGCTT GGTTTAATGA CGGCTCGTTT CTTTTCTGTG GTCGCGTGAA
1001 AGCCTTAAAG GGCTCCGGGA GGGCCCTTTG TCGGGGGGGG AGCGGCTCGG
1051 GGGGTGCGTG CGTGTGTGTG TGCGTGGGGA GCGCCGCGTG CGGCCCGCGC
1101 TGCCCGGCGG CTGTGAGCGC TGCGGGCGCG GCGCGGGGCT TTGTGCGCTC
1151 CGCGTGTGCG CGAGGGGAGC GCGGCCGGGG GCGGTGCCCC GCGGTGCGGG
1201 GGGGCTGCGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGGG
1251 TGAGCAGGGG GTGTGGGCGC GCGGTCGGG CTGTAACCCC CCCCTGCACC
1301 CCCCTCCCCG AGTTGCTGAG CACGGCCCGG CTTCGGGTGC GGGGCTCCGT
1351 GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT CGCCGTGCCG GCGGGGGGGT GCGGCGAGGT
1401 GGGGTGCGCG GCGGGGCGG GGCCGCCCTCG GGCCGGGGAG GGCTCGGGGG
1451 AGGGGCGCGG CGGCCCGGA GCGCCGCGCG CTGTCGAGGC GCGGCGAGCC
1501 GCAGCCATTG CTTTTTATGG TAATCGTGC AGAGGGCGCA GGGACTTCCT
1551 TTGTCCCAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGGCGCCG CCGCACCCCC
1601 TCTAGCGGGC GCGGGCGAAG CGGTGCGGCG CCGGCAGGAA GGAAATGGGC
1651 GGGGAGGGCC TTCGTGCGTC GCGCGCCGCG CGTCCCCTTC TCCATCTCCA
1701 GCCTCGGGGC TGCCGCAGGG GGACGGCTGC CTTCGGGGGG GACGGGGCAG
1751 GCGGGGGTTC GGCTTCTGGC GTGTGACCGG CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA
1801 ACCATGTTCA TGCCTTCTTC TTTTCTCTAC AGCTCCTGGG CAACGTGCTG
1851 GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGGCAAA GAATTCTAAT ACGACTCACT
1901 ATAGGGAGAC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACCATG GCGGGGCTCT
1951 GGCTGGGGCT CGTGTGGCAG AAGCTGCTGC TGTGGGGCGC GCGGAGTGCC
2001 CTTTCCCTGG CCGGCGCCAG TCTGGTCCTG AGCCTGCTGC AGAGGGTGGC
2051 GAGCTACGCG CGGAAATGGC AGCAGATGCG GCCCATCCCC ACGGTGGCCC
2101 GCGCCTACCC ACTGGTGGGC CACGCGCTGC TGATGAAGCC GGACGGGCGA
2151 GAATTTTTTC AGCAGATCAT TGAGTACACA GAGGAATACC GCCACATGCC
2201 GCTGCTGAAG CTCTGGGTGC GGCCAGTGCC CATGGTGGCC CTTTATAATG
2251 CAGAAAATGT GGAGGTAATT TTAAGTAGTT CAAAGCAAAT TGACAAATCC
2301 TCTATGTACA AGTTTTTAGA ACCATGGCTT GGCCTAGGAC TTCTTACAAG
2351 TACTGGAAC AAATGGCGCT CCAGGAGAAA GATGTTAACA CCCACTTTCC
2401 ATTTTACCAT TCTGGAAGAT TTCTTAGATA TCATGAATGA ACAAGCAAAT
2451 ATATTGGTTA AGAACTTGA AAAACACATT AACCAGAAG CATTTAACTG
2501 CTTTTTTTAC ATCACTCTTT GTGCCTTAGA TATCATCTGT GAAACAGCTA
2551 TGGGGAAGAA TATTGGTGCT CAAAGTAATG ATGATTCCGA GTATGTCCGT
2601 GCAGTTTATA GAATGAGTGA GATGATATTT CGAAGAATAA AGATGCCCTG
2651 GCTTTGGCTT GATCTCTGGT ACCTTATGTT TAAAGAAGGA TGGGAACACA
2701 AAAAGAGCCT TCAGATCCTA CATACTTTTA CCAACAGTGT CATCGCTGAA

```

```

2751 CGGGCCAATG AAATGAACGC CAATGAAGAC TGTAGAGGTG ATGGCAGGGG
2801 CTCTGCCCCC TCCAAAAATA AACGCAGGGC CTTTCTTGAC TTGCTTTTAA
2851 GTGTGACTGA TGACGAAGGG AACAGGCTAA GTCATGAAGA TATTCGAGAA
2901 GAAGTTGACA CCTTCATGTT TGAGGGGGCAC GATACAACTG CAGCTGCAAT
2951 AAACTGGTCC TTATACCTGT TGGGTTCTAA CCCAGAAGTC CAGAAAAAAG
3001 TGGATCATGA ATTGGATGAC GTGTTTGGGA AGTCTGACCG TCCCCTACA
3051 GTAGAAGACC TGAAGAACT TCGGTATCTG GAATGTGTTA TTAAGGAGAC
3101 CCTTCGCCTT TTTCCCTCTG TTCCTTTATT TGCCCGTAGT GTTAGTGAAG
3151 ATTGTGAAGT GGCAGGTTAC AGAGTTCTAA AAGGCACTGA AGCCGTCATC
3201 ATTCCCTATG CATTGCACAG AGATCCGAGA TACTTCCCCA ACCCCGAGGA
3251 GTTCCAGCCT GAGCGGTTCT TCCCCGAGAA TGCACAAGGG CGCCATCCAT
3301 ATGCCTACGT GCCCTTCTCT GCTGGCCCCA GGAAGTGTAT AGGTCAAAAG
3351 TTTGCTGTGA TGGAAGAAAA GACCATTCTT TCGTGCATCC TGAGGCACTT
3401 TTGGATAGAA TCCAACCAGA AAAGAGAAGA GCTTGGTCTA GAAGGACAGT
3451 TGATTCTTCG TCCAAGTAAT GGCATCTGGA TCAAGTTGAA GAGGAGAAAT
3501 GCAGATGAAC GCTAAGCGGC CGCAACTCGA GACTCTAGAG GTTAATCGAT
3551 AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
3601 CTATGTTGCT CTTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCTTTGT
3651 ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTGTATATAA
3701 TCCTGGTTGC TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG
3751 TGGCGTGGTG TGCCTGTGT TTGCTGACGC AACCCCACT GGTGGGGCA
3801 TTGCCACCAC CTGTCAGCTC CTTTCCGGGA CTTTCGCTTT CCCCCTCCCT
3851 ATTGCCACGG CGGAACCTCAT CGCCGCTGC CTTGCCCGCT GCTGGACAGG
3901 GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATTCCGT GGTGTTGTCT GGGAAATCAT
3951 CGTCCTTTCC TTGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGCGGG
4001 ACGTCCTTCT GCTACGTCCC TTCGGCCCTC AATCCAGCGG ACCTTCCTTC
4051 CCGCGGCCTG CTGCCGGCTC TGCGGCCTCT TCCGCGTCTT CGCCTTCGCC
4101 CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCCG CCTCCCCGCA TCGAAACCCG
4151 CTGACTAGAC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC
4201 TCCCCCGTGC CTTCTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC
4251 CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTCAATTCTA
4301 TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC
4351 AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCCG CGGGCCGCAG
4401 GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG CTCGCTCGCT
4451 CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTCGCCCC ACGCCCGGGC TTTGCCCGGG
4501 CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

```

SEQ ID NO: 62 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en AAV8.CYP4V2fv. AAV8.CYP4V2fv tiene el mismo promotor (CAG), potenciador (WPRe) y poliA (poliA-bGH) y secuencias de unión/enlazador que AAV5.CYP4V2st (SEQ ID NO: 61) y difiere solo en la secuencia de ADNc de CYP4V2:

ITR-Izquierda: 1-141
 Promotor CAG: 166-1880
 ADNc de CYP4V2fv: 1938-3515
 Potenciador WPRe: 3551-4139
 poliA de bGH: 4163-4387
 ITR-Derecha: 4399-4539

ES 2 985 828 T3

```

1 CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
51 CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
101 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTCC TGCGGCCTAA
151 GGCAATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA
201 ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA
251 ACTTACGGTA AATGGCCCCG CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCCGCCCAT
301 TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC
351 CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTGGCAGT
401 ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACC
451 GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT
501 CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTGC
551 AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTCACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCCA
601 CCCCCAATTT TGTATTTATT TATTTTTTAA TTATTTTGTG CAGCGATGGG
651 GCGGGGGGGG GGGGGGGCGC GCGCCAGGCG GGGCGGGGGC GGGCGAGGGG
701 CGGGGCGGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGCGC
751 GCTCCGAAAG TTTCCTTTTA TGGCGAGGCG GCGGCGGCGG CGGCCCTATA
801 AAAAGCGAAG CGCGCGGCGG GCGGAGTTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCCGT
851 GCCCGCGCTC GCGCGCGCTC GCGCCGCCCG CCCC GGCTCT
901 GTTACTCCCA CAGGTGAGCG GCGGGGACGG CCCTTCTCCT CCGGGCTGTA
951 ATTAGCGCTT GGTTTAAATGA CGGCTCGTTT CTTTTCTGTG GCTGCGTGAA
1001 AGCCTTAAAG GGCTCCGGGA GGGCCCTTTG TGCGGGGGGG AGCGGCTCGG
1051 GGGGTGCGTG CGTGTGTGTG TGCGTGGGGA GCGCCGCGTG CGGCCCCGCG
1101 TGCCCGGCGG CTGTGAGCGC TGCGGGGCGG GCGCGGGGCT TTGTGCGCTC
1151 CGCGTGTGCG CGAGGGGAGC GCGGCCGGGG GCGGTGCCCC GCGGTGCGGG
1201 GGGGCTGCGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGGG
1251 TGAGCAGGGG GTGTGGGCGC GCGGTCGGG CTGTAACCCC CCCCTGCACC
1301 CCCCTCCCCG AGTTGCTGAG CACGCCCCGG CTTGCGGTGC GGGGCTCCGT
1351 GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT CGCCGTGCCG GCGGGGGGGT GCGGCGAGGT
1401 GGGGGTGCCG GCGGGGCGG GCGCCCTCG GCGCGGGGAG GGCTCGGGGG
1451 AGGGGCGCGG CGGCCCCGGA GCGCCGCGG CTGTGAGGCC GCGGCGAGCC
1501 GCAGCCATTG CTTTTTATGG TAATCGTGC AGAGGGCGCA GGGACTTCCT
1551 TTGTCCCAAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGGCGCCG CCGCACCCCC
1601 TCTAGCGGGC GCGGGCGAAG CGGTGCGGCG CCGGCAGGAA GGAAATGGGC
1651 GGGGAGGGCC TTCGTGCGTC GCGCGCCGCG CGTCCCCCTC TCCATCTCCA
1701 GCCTCGGGGC TGCCGCAGGG GGACGGCTGC CTTGCGGGGG GACGGGGCAG
1751 GCGGGGGTTC GGCTTCTGGC GTGTGACCGG CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA
1801 ACCATGTTCA TGCCTTCTTC TTTTTCCTAC AGCTCCTGGG CAACGTGCTG
1851 GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGGCAAA GAATTCTAAT ACGACTCACT
1901 ATAGGGAGAC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACCATG GCGGGGCTCT
1951 GGCTGGGGCT CGTGTGGCAG AAGCTGCTGC TGTGGGGCGC GCGGAGTGCC
2001 CTTTCCCTGG CCGGCGCCAG TCTGGTCCTG AGCCTGCTGC AGAGGGTGGC
2051 GAGCTACGCG CGGAAATGGC AGCAGATGCG GCCCATCCCC ACGGTGGCCC
2101 GCGCCTACCC ACTGGTGGGC CACGCGCTGC TGATGAAGCC GGACGGGCGA
2151 GAATTTTTTC AGCAGATCAT TGAGTACACA GAGGAATACC GCCACATGCC
2201 GCTGCTGAAG CTCTGGGTCG GGCCAGTGCC CATGGTGGCC CTTTATAATG
2251 CAGAAAATGT GGAGTAATT TTAAGTAGTT CAAAGCAAAT TGACAAATCC
2301 TCTATGTACA AGTTTTTAGA ACCATGGCTT GGCCTAGGAC TTCTTACAAG
2351 TACTGGAAAC AAATGGCGCT CCAGGAGAAA GATGTTAACA CCCACTTTCC
2401 ATTTTACCAT TCTGGAAGAT TTCTTAGATA TCATGAATGA ACAAGCAAAT
2451 ATATTGGTTA AGAACTTGA AAAACACATT AACCAAGAAG CATTTAACTG
2501 CTTTTTTTAC ATCACTCTTT GTGCCTTAGA TATCATCTGT GAAACAGCTA
2551 TGGGGAAGAA TATTGGTGCT CAAAGTAATG ATGATCCGA GTATGTCCGT
2601 GCAGTTTATA GAATGAGTGA GATGATATTT CGAAGAATAA AGATGCCCTG

```

```

2651 GCTTTGGCTT GATCTCTGGT ACCTTATGTT TAAAGAAGGA TGGGAACACA
2701 AAAAGAGCCT TAAGATCCTA CATACTTTTA CCAACAGTGT CATCGCGGAA
2751 CGGGCCAATG AAATGAACGC CAATGAAGAC TGTAGAGGTG ATGGCAGGGG
2801 CTCTGCCCCC TCCAAAAATA AACGCAGGGC CTTTCTTGAC TTGCTTTTAA
2851 GTGTGACTGA TGACGAAGGG AACAGGCTAA GTCATGAAGA TATTCGAGAA
2901 GAAGTTGACA CCTTCATGTT TGAGGGGCAC GATACAACTG CAGCTGCAAT
2951 AAAGTGGTCC TTATACCTGT TGGGTTCTAA CCCAGAAGTC CAGAAAAAAG
3001 TGGATCATGA ATTGGATGAC GTGTTTGGGA AGTCTGACCG TCCCGCTACA
3051 GTAGAAGACC TGAAGAAACT TCGGTATCTG GAATGTGTTA TTAAGGAGAC
3101 CCTTCGCCTT TTTCTTCTG TTCCTTTATT TGCCCGTAGT GTTAGTGAAG
3151 ATTGTGAAGT GGCAGGTTAC AGAGTTCTAA AAGGCACTGA AGCCGTCATC
3201 ATTCCCTATG CATTGCACAG AGATCCGAGA TACTTCCCCA ACCCCGAGGA
3251 GTTCCAGCCT GAGCGGTTCT TCCCCGAGAA TGCACAAGGG CGCCATCCAT
3301 ATGCCTACGT GCCCTTCTCT GCTGGCCCCA GGAAGTGTAT AGGTCAAAAAG
3351 TTTGCTGTGA TGGAAGAAAA GACCATTCTT TCGTGCATCC TGAGGCACTT
3401 TTGGATAGAA TCCAACCAGA AAAGAGAAGA GCTTGGTCTA GAAGGACAGT
3451 TGATTCTTCG TCCAAGTAAT GGCATCTGGA TCAAGTTGAA GAGGAGAAAT
3501 GCAGATGAAC GCTAAGCGGC CGCAACTCGA GACTCTAGAG GTTAATCGAT
3551 AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
3601 CTAIGTTGCT CTTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCTTTGT
3651 ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTGTATATAA
3701 TCCTGGTTGC TGTCTCTTAA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG
3751 TGGCGTGGTG TGCATGTGT TTGCTGACGC AACCCCACT GGTGGGGCA
3801 TTGCCACCAC CTGTCAGCTC CTTTCCGGGA CTTTCGCTTT CCCCCTCCCT
3851 ATTGCCACGG CGGAATCAT CGCCGCCTGC CTTGCCCGCT GCTGGACAGG
3901 GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATTCCGT GGTGTTGTG GGGAAATCAT
3951 CGTCCTTTCC TTGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGCGGG
4001 ACGTCCTTCT GCTACGTCCC TTCGGCCCTC AATCCAGCGG ACCTTCCTTC
4051 CCGCGGCCTG CTGCCGGCTC TGCGGCCTCT TCCGCGTCTT CGCCTTCGCC
4101 CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCGG CCTCCCCGCA TCGAAAACCG
4151 CTGACTAGAC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC
4201 TCCCCCGTGC CTTCTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC
4251 CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA
4301 TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC
4351 AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCCG CGGGCCGCAG
4401 GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG CTCGCTCGCT
4451 CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTCGCCCC ACGCCCGGGC TTTGCCCGGG
4501 CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

```

SEQ ID NO: 63 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en AAV5.CYP4V2op (nuevo). AAV5.CYP4V2op (nuevo) tiene el mismo promotor (CAG), potenciador (WPRE) y poliA (poliA-bGH) y las mismas secuencias de unión/enlazador que AAV5.CYP4V2st (SEQ ID NO: 61) y AAV8.CYP4V2fv (SEQ ID NO: 62), pero secuencias de ADNc de CYP4V2 diferentes:

ITR-Izquierda: 1-141
 Promotor CAG: 166-1880
 ADNc de CYP4V2op: 1938-3515
 Potenciador WPRE: 3551-4139
 poliA de bGH: 4163-4387
 ITR-Derecha: 4399-4539

CCTGCAGGCA GCTGCGCGCT CGCTCGCTCA CTGAGGCCGC CCGGGCAAAG
 CCCGGGCGTC GGGCGACCTT TGGTCGCCCC GCCTCAGTGA GCGAGCGAGC
 GCGCAGAGAG GGAGTGGCCA ACTCCATCAC TAGGGGTTC TGCGGCCTAA
 GGCAATTGAG ATCTCGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA
 ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT ATGGAGTTCC GCGTTACATA
 ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCCGCCCAT
 TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG TAACGCCAAT AGGGACTTTC
 CATTGACGTC AATGGGTGGA CTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTGGCAGT
 ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTACGCC CCCTATTGAC GTCAATGACG
 GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCCAGT ACATGACCTT ATGGGACTTT
 CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC ATCGCTATTA CCATGGGTTCG
 AGGTGAGCCC CACGTTCTGC TTCACTCTCC CCATCTCCCC CCCCTCCCCA
 CCCCCAATTT TGTATTTATT TATTTTITTA TTATTTTGTG CAGCGATGGG
 GCGGGGGGGG GGGGGGGCGC GCGCCAGGCG GGGCGGGGCG GGGCGAGGGG
 CGGGGCGGGG CGAGGCGGAG AGGTGCGGCG GCAGCCAATC AGAGCGGCGC
 GCTCCGAAAG TTTCTTTTAA TGGCGAGGCG GCGCGGGCGG CGGCCCTATA
 AAAAGCGAAG CGCGCGGCGG GCGGGAGTCG CTGCGTTGCC TTCGCCCCGT
 GCCCCGCTCC GCGCCGCCTC GCGCCGCCCG CCCC GGCTCT GACTGACCGC
 GTTACTCCCA CAGGTGAGCG GGCGGGACGG CCCTTCTCCT CCGGGCTGTA
 ATTAGCGCTT GGTTTAATGA CGGCTCGTTT CTTTTCTGTG GCTGCGTGAA
 AGCCTTAAAG GGCTCCGGGA GGGCCCTTTG TGCGGGGGGG AGCGGCTCGG
 GGGTGCGTG CGTGTGTGTG TGCGTGGGGA GCGCCGCGTG CCGCCCGCGC
 TGCCCGGCGG CTGTGAGCGC TGCGGGCGCG GCGCGGGGCT TTGTGCGCTC
 CGCGTGTGCG CGAGGGGAGC GCGGCCGGGG GCGGTGCCCC GCGGTGCGGG
 GGGGCTGCGA GGGGAACAAA GGCTGCGTGC GGGGTGTGTG CGTGGGGGGG
 TGAGCAGGGG GTGTGGGCGC GGCGGTCGGG CTGTAACCCC CCCCTGCACC
 CCCCTCCCCG AGTTGCTGAG CACGGCCCCG CTTCGGGTGC GGGGCTCCGT
 GCGGGGCGTG GCGCGGGGCT CGCCGTGCCG GCGGGGGGGT GGCGGCAGGT
 GGGGGTGCCG GCGGGGGCGG GGCCGCTCG GGCCGGGGAG GGCTCGGGGG
 AGGGGCGCGG CGGCCCGGGA GCGCCGCGCG CTGTGAGGCG GCGGCGAGCC
 GCAGCCATTG CTTTTTATGG TAATCGTGCG AGAGGGCGCA GGGACTTCCT
 TTGTCCCAAA TCTGGCGGAG CCGAAATCTG GGAGGCGCCG CCGCACCCCC
 TCTAGCGGGC GCGGGCGAAG CGGTGCGGCG CCGGCAGGAA GGAAATGGGC
 GGGGAGGGCC TTCGTGCGTC GCCGCGCCGC CGTCCCCTTC TCCATCTCCA
 GCCTCGGGG TGCCGCAGGG GGACGGCTGC CTTGCGGGGG GACGGGGCAG
 GCGGGGGTTC GGCTTCTGGC GTGTGACCGG CGGCTCTAGA GCCTCTGCTA
 ACCATGTTCA TGCCTTCTTC TTTTTCCTAC AGCTCCTGGG CAACGTGCTG
 GTTATTGTGC TGTCTCATCA TTTTGGCAAA GAATTCTAAT ACGACTCACT
 ATAGGGAGAC CCAAGCTGGC TAGCCAAAGC TTCCACC
 ATGGCTGGACTGTGGCTGGGACTGGTGTGGCAGAAACTGCTGCTGTGGGGGGCCGCTTCCGCACTGTCAC
 TGGCTGGGGCTTCACTGGTGCTGAGCCTGCTGCGAGAGGGTGGCCTCCTACGCCAGAAAGTGGCAGCAGAT
 GAGGCCCATCCCTACCGTGGCCAGAGCCTATCCACTGGTGGGACACGCACTGCTGATGAAGCCTGACGGC
 AGAGAGTTCTTTCAGCAGATCATCGAGTACACAGAGGAGTATAGGCACATGCCACTGCTGAAGCTGTGGG
 TGGGACCCGTGCCTATGGTGGCCCTGTACAACGCCGAGAATGTGGAAGTGATCCTGACCAGCAGCAAGCA
 GATCGATAAAGTCTAGCATGTATAAGTTCCCTGGAGCCTTGGCTGGGCCCTGGGCCTGCTGACCTCTACAGGC
 AACAAAGTGAGGAGCCGGAGAAAGATGCTGACCCCAACATTCACCTTTACAATCCTGGAGGACTTCCTGG
 ACATCATGAACGAGCAGGCCAATATCCTGGTGAAGAAGCTGGAGAAGCACATCAACCAGGAGGCCTTTAA
 TTGCTTCTTTTACATCACCTGTGCGCCCTGGACATCATCTGTGAGACAGCTATGGGCAAGAACATCGGC
 GCCAGTCTAATGACGATAGCGAGTACGTGCGGGCCGTGTATAGAATGAGCGAGATGATCTTTAGGCGCA
 TCAAGATGCCCTGGCTGTGGCTGGATCTGTGGTATCTGATGTTCAAGGAGGGCTGGGAGCACAAGAAGTC
 CCTGCAGATCCTGCACACCTTTACAACTCTGTGATCGCCGAGAGAGCCAATGAGATGAACGCCAATGAG
 GACTGTAGGGGCGATGGAAGGGGCGCGCCCCCTTCCAAGAACAAGCGGAGAGCCTTCCCTGGACCTGCTGC
 TGAGCGTGACCGACGATGAGGGCAATCGCCTGTCCCACGAGGACATCCGGGAGGAGGTGGATACATTCAT

GTTTGAGGGACACGACACCACAGCCGCCCATCAACTGGTCCCTGTACCTGCTGGGCTCTAATCCAGAG
GTGCAGAAGAAGGTGGATCACGAGCTGGACGACGTGTTTCGGCAAGTCCGACAGGCCAGCAACCGTGGAGG
ATCTGAAGAAGCTGAGATACCTGGAGTGCGTGATCAAGGAGACACTGCGCCTGTTCCCCTCTGTGCCTCT
GTTTGCCCCGGTCCGTGTCTGAGGACTGTGAGGTGGCCGGCTATCGCGTGCTGAAGGGCACCAGGCGCGTG
ATCATCCCTTACGCCCTGCACCGGGACCCAGGTATTTCCCTAACCAGAGGAGTTTCAGCCAGAGAGAT
TCTTTCCCAGAGAATGCCAGGGCAGGCACCCCTTACGCCTATGTGCCATTCTCCGCCGGACCAAGGAACCTG
CATCGGACAGAAGTTTGGCGTGATGGAGGAGAAAACCATCCTGTCTTGATCCTGAGACACTTCTGGATC
GAGAGCAATCAGAAGAGGGAGGAGCTGGGCCTGGAGGGACAGCTGATCCTGCGGCCAAGCAACGGCATCT
GGATCAAACTGAAAAGAAGGAACGCTGACGAGAGGTAAGCGGC CGCAACTCGA GACTCTAGAG
GTTAATCGAT

AATCAACCTC TGGATTACAA AATTTGTGAA AGATTGACTG GTATTCTTAA
CTATGTTGCT CTTTTTACGC TATGTGGATA CGCTGCTTTA ATGCCTTTGT
ATCATGCTAT TGCTTCCCGT ATGGCTTTCA TTTTCTCCTC CTGTATATAA
TCCTGGTTGC TGTCTCTTTA TGAGGAGTTG TGGCCCGTTG TCAGGCAACG
TGCGTGTTG TGCCTGTGT TTGCTGACGC AACCCCACT GGTGGGGCA
TTGCCACCAC CTGTCAGCTC CTTTCCGGGA CTTTCGCTTT CCCCCTCCCT
ATTGCCACGG CGGAACCTCAT CGCCGCTGC CTTGCCCGCT GCTGGACAGG
GGCTCGGCTG TTGGGCACTG ACAATTCCGT GGTGTTGTCG GGGAAATCAT
CGTCCTTTCC TTGGCTGCTC GCCTGTGTTG CCACCTGGAT TCTGCGCGGG
ACGTCTTTCT GCTACGTCCC TTCGGCCCTC AATCCAGCGG ACCTTCCTTC
CCGCGGCTG CTGCCGGCTC TGCGGCTCT TCCGCTCTT CGCCTTCGCC
CTCAGACGAG TCGGATCTCC CTTTGGGCGG CCTCCCCGCA TCGAAACCCG
CTGACTAGAC GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT GTTTTGCCCC
TCCCCCGTGC CTTCTTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC
CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTCATTCTA
TTCTGGGGGG TGGGTTGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC
AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCCG CGGGCCGCAG
GAACCCCTAG TGATGGAGTT GGCCACTCCC TCTCTGCGCG CTCGCTCGCT
CACTGAGGCC GGGCGACCAA AGGTGCGCCG ACGCCCGGGC TTTGCCCCGGG
CGGCCTCAGT GAGCGAGCGA GCGCGCAGCT GCCTGCAGG

SEQ ID NO: 64 - Secuencia del casete de expresión de CYP4V2 en scAAV1.CYP4V2op, scAAV5.CYP4V2op y scAAV9.CYP4V2op.

5

ITR-Izquierda (truncada): 1-117
Promotor EFS: 130-364
ADNc de CYP4V2op: 520-2097
SPA: 2116-2169

10

ITR-Derecha: 2263-2403

1 cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag
cccgggcgct
61 gggcgacett tggcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag
ggagtggacg
121 cgtaggcctg attggctccg gtgcccgtca gtgggcagag cgcacatcgc
ccacagtccc
181 cgagaagttg gggggagggg tcggcaattg aaccggtgcc tagagaaggt
ggcgcggggt
241 aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt cccgaggggtg
ggggagaacc
301 gtatataagt gcagtagtcg ccgtgaacgt tctttttcgc aacggggtttg
ccgccagaac
361 acaggtgtcg tgacgcgacc aggtatgcat ctgcagctct aaggtaaata
taaaattttt

ES 2 985 828 T3

421 aagtgtataa tgtgttaaac tactgattct aattgtttct ctcttttaga
 ttccaacctt
 481 tggaactgac tgcagggatc caagctttct agagccacca tggctggact
 gtggctggga
 541 ctgggtgtggc agaaactgct gctgtggggg gccgttccg cactgtcact
 ggctggggct
 601 tcaactggtgc tgagcctgct gcagaggggt gcctcctacg ccagaaagtg
 gcagcagatg
 661 aggcccatcc ctaccgtggc cagagcctat ccactgggtgg gacacgcact
 gctgatgaag
 721 cctgacggca gagagttctt tcagcagatc atcgagtaca cagaggagta
 taggcacatg
 781 ccactgctga agctgtgggt gggacccgtg cctatgggtgg ccctgtacaa
 cgccgagaat
 841 gtggaagtga tcctgaccag cagcaagcag atcgataagt ctagcatgta
 taagttcctg
 901 gaggccttggc tgggcctggg cctgctgacc tctacaggca acaagtggag
 gagccggaga
 961 aagatgctga cccaacatt ccactttaca atcctggagg acttcctgga
 catcatgaac
 1021 gagcaggcca atatcctggt gaagaagctg gagaagcaca tcaaccagga
 ggcctttaat
 1081 tgcttctttt acatcacctt gtgcgccctg gacatcatct gtgagacagc
 tatgggcaag
 1141 aacatcggcg cccagtctaa tgacgatagc gagtacgtgc gggccgtgta
 tagaatgagc
 1201 gagatgatct ttaggcgcat caagatgcc tggctgtggc tggatctgtg
 gtatctgatg
 1261 ttcaaggagg gctgggagca caagaagtcc ctgcagatcc tgcacacctt
 taaaaactct
 1321 gtgatcgccg agagagccaa tgagatgaac gccaatgagg actgtagggg
 cgatggaagg
 1381 ggcagcgccc ctccaagaa caagcggaga gccttcctgg acctgctgct
 gagcgtgacc
 1441 gacgatgagg gcaatcgctt gtcccacgag gacatccggg aggaggtgga
 tacattcatg
 1501 tttgagggac acgacaccac agccgccgccc atcaactggg ccctgtacct
 gctgggctct
 1561 aatccagagg tgcagaagaa ggtggatcac gagctggacg acgtgttcgg
 caagtccgac
 1621 aggccagcaa ccgtggagga tctgaagaag ctgagatacc tggagtgcgt
 gatcaaggag
 1681 aactgcgcc tgttcccctc tgtgcctctg tttgcccggt ccgtgtctga
 ggactgtgag
 1741 gtggccggct atcgcgtgct gaagggcacc gaggccgtga tcatccctta
 cgccctgcac
 1801 cgggacccca ggtatttccc taaccagag gagtttcagc cagagagatt
 ctttcccag
 1861 aatgcccagg gcaggcacc ttacgcctat gtgccattct ccgccggacc
 aaggaactgc
 1921 atcgacaga agtttgccgt gatggaggag aaaaccatcc tgtcttztat
 cctgagacac

ES 2 985 828 T3

1981 ttctggatcg agagcaatca gaagagggag gagctgggcc tggagggaca
gctgacctg
2041 cggccaagca acggcatctg gatcaaactg aaaagaagga acgctgacga
gaggtaaaag
2101 cttgaattcc tcgaggatcc aataaaagat ctttattttc attagatctg
tgtgttggtt
2161 ttttgtgtgt ctagttgccca gccatctggt gtttgccct ccccggtgcc
ttccttgacc
2221 ctggaagggt ccactcccag tttaaactta attaagggcc gcaggaaccc
ctagtgatgg
2281 agttggccac tccctctctg cgcgctcgt cgctcactga ggccgggcca
ccaaagggtc
2341 cccgacgcc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcg
agctgcctgc
2401 agg

REIVINDICACIONES

1. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína CYP4V2 no mutante o funcional o una variante funcional de la misma que tiene al menos un 96 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 4-6 y 19-29 unida operativamente a al menos una secuencia reguladora, en donde el vector es un vector de virus adenoasociado recombinante (rAAV).
2. El vector de la reivindicación 1, en donde el vector de rAAV comprende una proteína de la cápside VP1, VP2 o VP3 seleccionada de cualquier serotipo de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV 11, AAV12, u otro serotipo o aislado o clado derivado de forma natural de AAV, o híbridos, variantes o derivados de los mismos, o en donde el vector de rAAV comprende una repetición terminal invertida (ITR) de AAV 5' o una ITR de AAV 3' seleccionada de una cualquiera de AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV 11, AAV12, u otro serotipo o aislado o clado derivado de forma natural de AAV, o mutaciones, quimeras, variantes o fusiones de los mismos.
3. El vector de la reivindicación 1 o 2, en donde el vector de rAAV es un AAV quimérico, un AAV reordenado o un AAV con cápside modificada, o en donde el vector de rAAV es un AAV pseudotipado, o en donde el vector de rAAV es un AAV híbrido.
4. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el vector de rAAV comprende una o más mutaciones en una o más proteínas de la cápside de AAV derivadas de forma natural, opcionalmente en donde la una o más mutaciones en la proteína de la cápside de AAV comprenden una o más sustituciones de restos de aminoácidos Y-F, K-R, T-A, S-A o T-V.
5. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el vector de rAAV se selecciona del grupo que consiste en AAV2/5, AAV2/8, AAV2/2, AAV2 (Y444F+Y500F+Y730F), AAV2/1, AAV2/9, AAV2/8(Y733F), AAV2/6, AAV2/4, AAV2/7, AAV5, AAV2, AAV8, AAV1, AAV9, AAV6, AAV10, AAV3, AAV4, AAV7, AAV11, AAV12, Anc80, AAV 7m8, AAV-DJ, ShH10, AAV-PHP.B, rh10 y un híbrido, un derivado o variante de los mismos, o en donde el vector de rAAV es un vector de AAV monocatenario o un vector de AAV autocomplementario (scAAV).
6. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la molécula de ácido nucleico tiene al menos un 76 % de identidad de secuencia con cualquiera de las SEQ ID NO: 1-3.
7. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la secuencia reguladora comprende un promotor, opcionalmente en donde el promotor es un promotor específico de células del epitelio pigmentario retiniano (RPE), un promotor específico de fotorreceptores, un promotor específico de células retinianas, un promotor específico de células corneales, un promotor específico de células oculares, un promotor con especificidad celular, un promotor histoespecífico, un promotor constitutivo, un promotor omnipresente, un promotor regulado, un promotor inducible o un derivado o híbrido de los mismos, u opcionalmente en donde el promotor se selecciona del grupo que consiste en un promotor CAG (también conocido como promotor CAGGS, promotor CB o promotor CBA), un promotor de beta actina de pollo, un promotor CBA pequeño (smCBA), un promotor CB^{SB}, un promotor CBh, un promotor de beta-actina, un promotor de beta actina humana, un promotor del factor de elongación 1 alfa corto (EFS), un promotor del factor de elongación 1 alfa (EF-1 alfa o EF-1 α), un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor PGK, un promotor UBC, un promotor GUSB, un promotor UCOE, un promotor VMD2 (distrofia macular viteliforme 2; también conocido como BEST1), un promotor RPE65, un promotor GRK1, un promotor proximal de la proteína de unión a retinoides interfotorreceptores (IRBP) humano, un fragmento de 235 nt del promotor hIRBP, un promotor proximal RPGR, el promotor de opsina de color rojo, un promotor de opsina de color rojo-verde, el promotor de opsina de color azul, el promotor de opsina de ratón, un promotor de rodopsina (Rho), un promotor de beta fosfodiesterasa (PDE), un promotor de retinitis pigmentosa (RP1), el promotor NXNL2/NXNL1, un promotor de degeneración retiniana lenta/periferina 2 (Rds/perphZ), un promotor IRBP/GNAT2 (potenciador hIRBP fusionado con el promotor de transducina alfa de cono), un promotor Rds (degeneración retiniana lenta), un promotor hPDE6b, un promotor VEcad (promotor VE-cadherina/Cadherina 5 (CDH5)/CD144), un promotor sensible al calcio, un promotor NFAT, un promotor de metaliohionina (MX) de oveja inducible por cinc, un promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) inducible por dexametasona (Dex), un sistema promotor de la polimerasa T7, un promotor de insectos de ecdisona, un sistema reprimible por tetraciclina, un sistema inducible por tetraciclina, un sistema inducible por RU486 y un sistema inducible por rapamicina, un híbrido, una variante y un derivado de los mismos.
8. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la secuencia reguladora comprende una secuencia Kozak, o

en donde la secuencia reguladora comprende un potenciador,
 opcionalmente en donde el potenciador comprende un elemento regulador postranscripcional (PRE), un sitio
 interno de entrada a ribosomas (IRES), una secuencia reguladora de intrones, un donante/aceptor de corte y
 empalme de mini-intrones (SD-SA) o un elemento de transporte constitutivo (CTE), u
 opcionalmente en donde el potenciador se selecciona del grupo que consiste en un potenciador del elemento
 regulador postranscripcional del virus de la hepatitis B (WPRE), un potenciador del elemento
 regulador postranscripcional del virus de la hepatitis B (HPRE o HBVPRE), un potenciador IRBP, un
 potenciador CTE del virus del mono Mason-Pfizer, un potenciador CTE del virus de la leucemia aviar, un
 potenciador temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) y un potenciador de SV40.

9. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde la secuencia reguladora comprende una señal
 de poliadenilación (poliA),
 opcionalmente en donde la señal de poliA se selecciona del grupo que consiste en una señal de poliadenilación
 de la hormona del crecimiento bovina (poliA de bGH), una señal de poliA pequeña (SPA), una señal de
 poliadenilación de la hormona del crecimiento humano (poliA de hGH), una señal de poliA de SV40, una señal de
 poliA temprana de SV40, una señal de poliA tardía de SV40, un derivado y un híbrido de los mismos.

10. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la secuencia reguladora comprende un
 potenciador en dirección 5' (USE) unido operativamente a una señal de poliA,
 opcionalmente en donde el USE se selecciona del grupo que consiste en 2xUSE tardío de SV40, USE del VIH-1
 (virus de inmunodeficiencia humana 1), USE del GHV (virus de la hepatitis de la ardilla terrestre), USE de
 Adenovirus (L3), USE de hTHGB (protrombina humana) y USE de hC2 (gen del complemento C2 humano).

11. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la secuencia reguladora comprende una
 secuencia de intrón, una secuencia UTR, una secuencia del sitio de corte y empalme, una secuencia de dominio
 regulador en dirección 5', una secuencia de elemento de respuesta, una secuencia de elemento inducible, un
 origen de secuencia de replicación, una secuencia de sitio interno de entrada a ribosomas (IRES), una secuencia
 de inicio de la transcripción, una secuencia de terminación, una secuencia de procesamiento de ARN, una
 secuencia de unión o una secuencia enlazadora, o

en donde la secuencia reguladora es heteróloga u homóloga con respecto a la secuencia codificante de
 CYP4V2 cuya expresión regula dicha secuencia reguladora, o
 en donde la secuencia reguladora comprende una secuencia diana de microARN (miARN) histoespecífica o
 con especificidad celular.

12. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, en donde cualquier parte del vector comparte al menos
 un 43 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias del casete de expresión de CYP4V2 en las
 SEQ ID NO: 60 a 64 o al menos un 43 % de identidad de secuencia con cualquiera de las siguientes secuencias:
 nucleótido (nt) 237 - nt 3579 de la SEQ ID NO 60; nt 166 - nt 3515 de la SEQ ID NO 61; nt 166 - nt 3515 de la SEQ
 ID NO 62; nt 166 - nt 3515 de la SEQ ID NO 63; o nt 130 - nt 2097 de la SEQ ID NO 64.

13. El vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en donde el vector se formula con un portador
 farmacéuticamente aceptable y componentes adicionales adecuados para una vía de administración específica.

14. Una célula que comprende el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13,

opcionalmente en donde la célula es una célula de mamífero o una célula de insecto,
 opcionalmente en donde la célula es una célula HEK293,
 opcionalmente en donde la célula es una célula epitelial pigmentaria retiniana (RPE), una célula fotorreceptora,
 una célula progenitora de fotorreceptores, una célula coroidea, una célula retiniana, una célula madre
 pluripotente inducida (iPS), o una célula madre, de o derivada de un sujeto humano que padece distrofia del
 cristalino de Bietti (BCD, también conocida como distrofia corneoretiniana del cristalino de Bietti, retinopatía
 del cristalino de Bietti, distrofia retiniana de Bietti) o retinitis pigmentosa (RP) o degeneración retiniana
 hereditaria (IRD) con mutaciones de CYP4V2.

15. Una célula de la reivindicación 14 para su uso en un método de tratamiento, detención o prevención de la
 distrofia del cristalino de Bietti (BCD, también conocida como distrofia corneoretiniana del cristalino de Bietti,
 retinopatía del cristalino de Bietti, distrofia retiniana de Bietti), o retinitis pigmentosa (RP) o degeneración retiniana
 hereditaria (IRD) con mutaciones de CYP4V2 en un sujeto humano que lo necesite, comprendiendo el método
 suministrar, al ojo del sujeto humano, una cantidad terapéuticamente eficaz de la célula.

16. Un vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en un método de tratamiento, detención
 o ralentización de la progresión, rescate o mejora de la disfunción, pérdida de función, distrofia, trastorno,
 degeneración, atrofia o prevención de la muerte de una célula ocular de un sujeto humano que tiene distrofia del
 cristalino de Bietti (BCD, también conocida como distrofia corneoretiniana del cristalino de Bietti, retinopatía del

- crystalino de Bietti, distrofia retiniana de Bietti) o retinitis pigmentosa (RP) o degeneración retiniana hereditaria (IRD) con mutaciones de CYP4V2, comprendiendo el método suministrar a la célula ocular una cantidad terapéuticamente eficaz del vector,
- 5 opcionalmente en donde la célula ocular es una célula de la retina, una célula epitelial pigmentaria retiniana (RPE), una célula fotorreceptora (bastón o cono), una célula epitelial corioidea, una célula del epitelio corneal, una célula corioidea, una célula corneal, una célula bipolar de la retina, una célula progenitora de fotorreceptores, una célula ganglionar o una célula del nervio óptico.
- 10 17. Un vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en un método de tratamiento, detención o prevención de la distrofia del cristalino de Bietti (BCD, también conocida como distrofia corneorretiniana del cristalino de Bietti, retinopatía del cristalino de Bietti, distrofia retiniana de Bietti), o retinitis pigmentosa (RP) o degeneración retiniana hereditaria (IRD) con mutaciones de CYP4V2 en un sujeto humano que lo necesite, comprendiendo el método: suministrar a una o más células oculares del sujeto humano una cantidad
- 15 terapéuticamente eficaz del vector, en donde la una o más células oculares se seleccionan de células epiteliales pigmentarias retinianas (RPE), una o más células corioideas y una o más células fotorreceptoras del sujeto humano.
- 20 18. Un vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en un método de tratamiento, detención o prevención de una enfermedad del sujeto humano que se asocia a la atrofia, distrofia, disfunción, degeneración o muerte de una célula ocular, comprendiendo el método: suministrar a la célula ocular del sujeto humano una cantidad terapéuticamente eficaz del vector, en donde la célula ocular es una célula RPE.
- 25 19. Un vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en un método de tratamiento, detención o prevención de una enfermedad del sujeto humano que se asocia a la atrofia, distrofia, disfunción, degeneración o muerte de una célula ocular, comprendiendo el método suministrar, al ojo del sujeto humano, una cantidad terapéuticamente eficaz de una célula RPE, célula progenitora fotorreceptora o célula madre, en donde dicha célula RPE, célula progenitora fotorreceptora o célula madre comprende el vector.

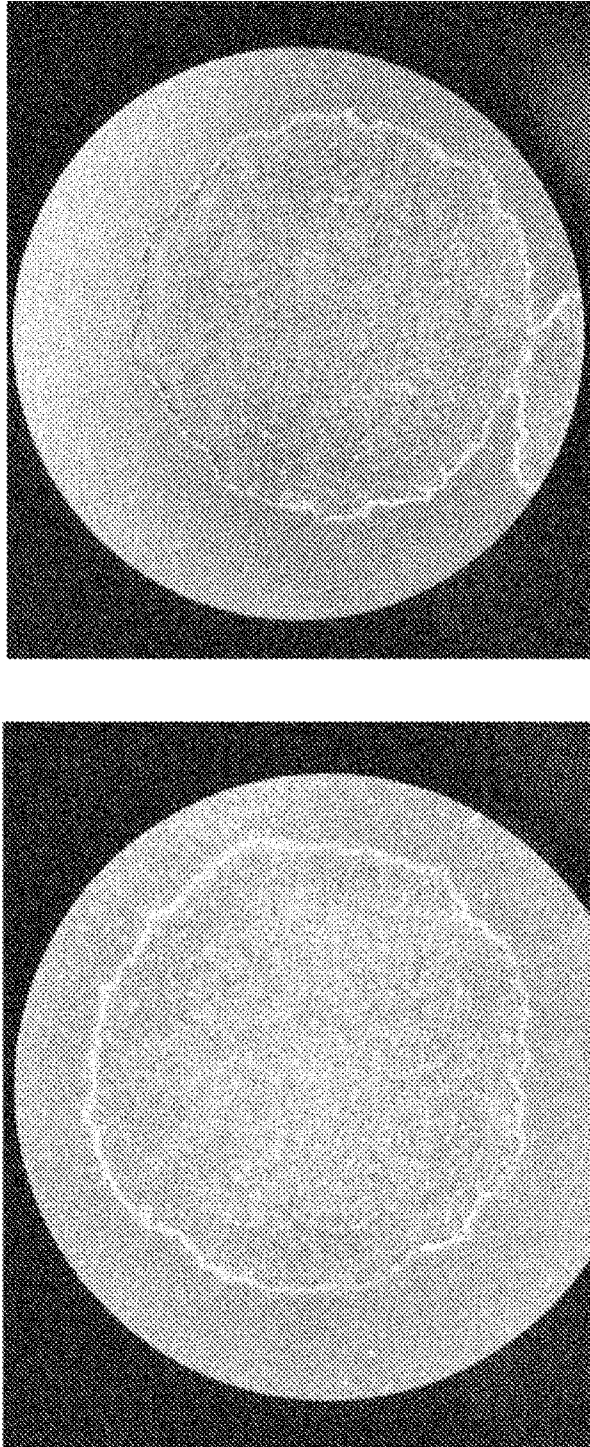


FIG. 1A(i)

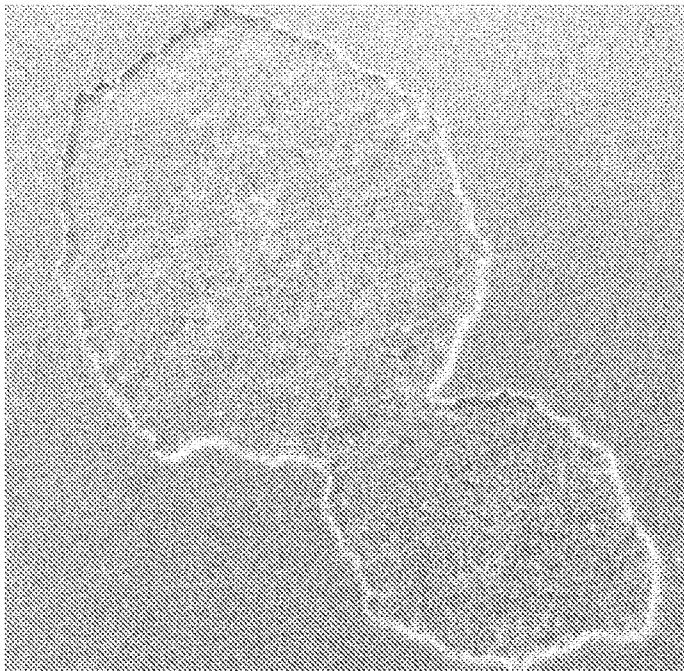
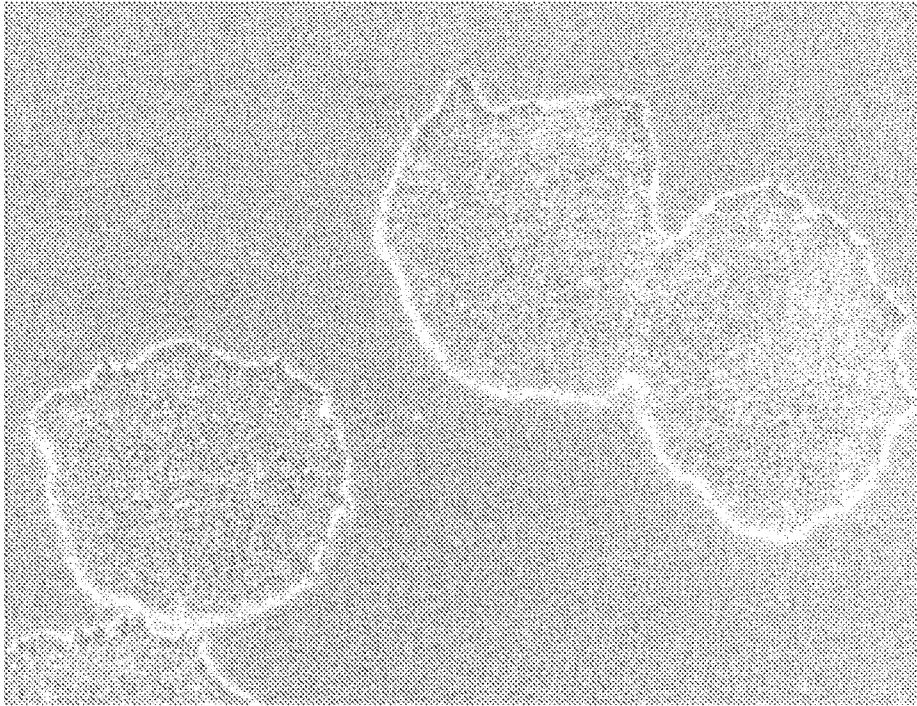


FIG. 1A(ii)

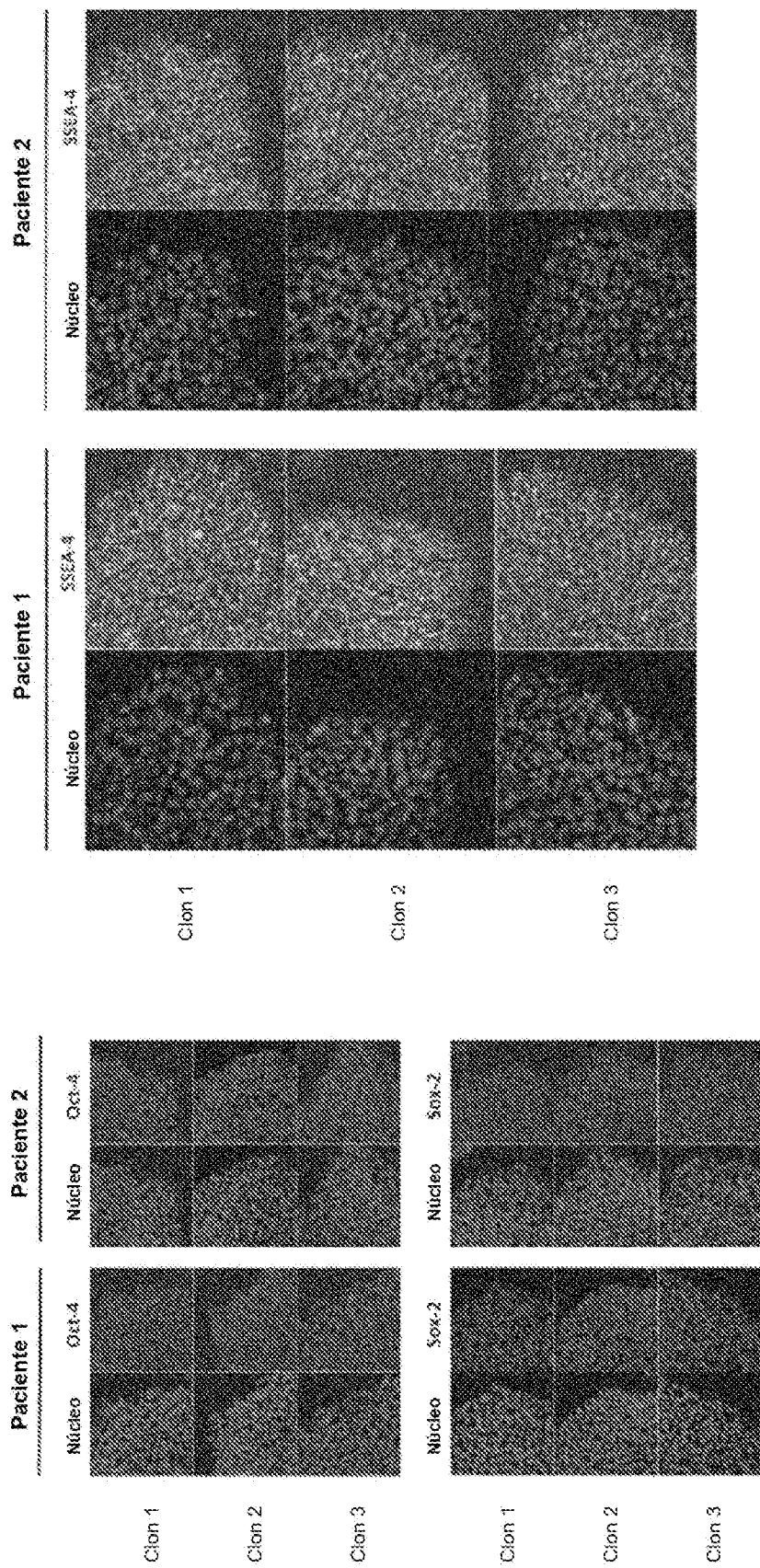


FIG. 1A(iii)

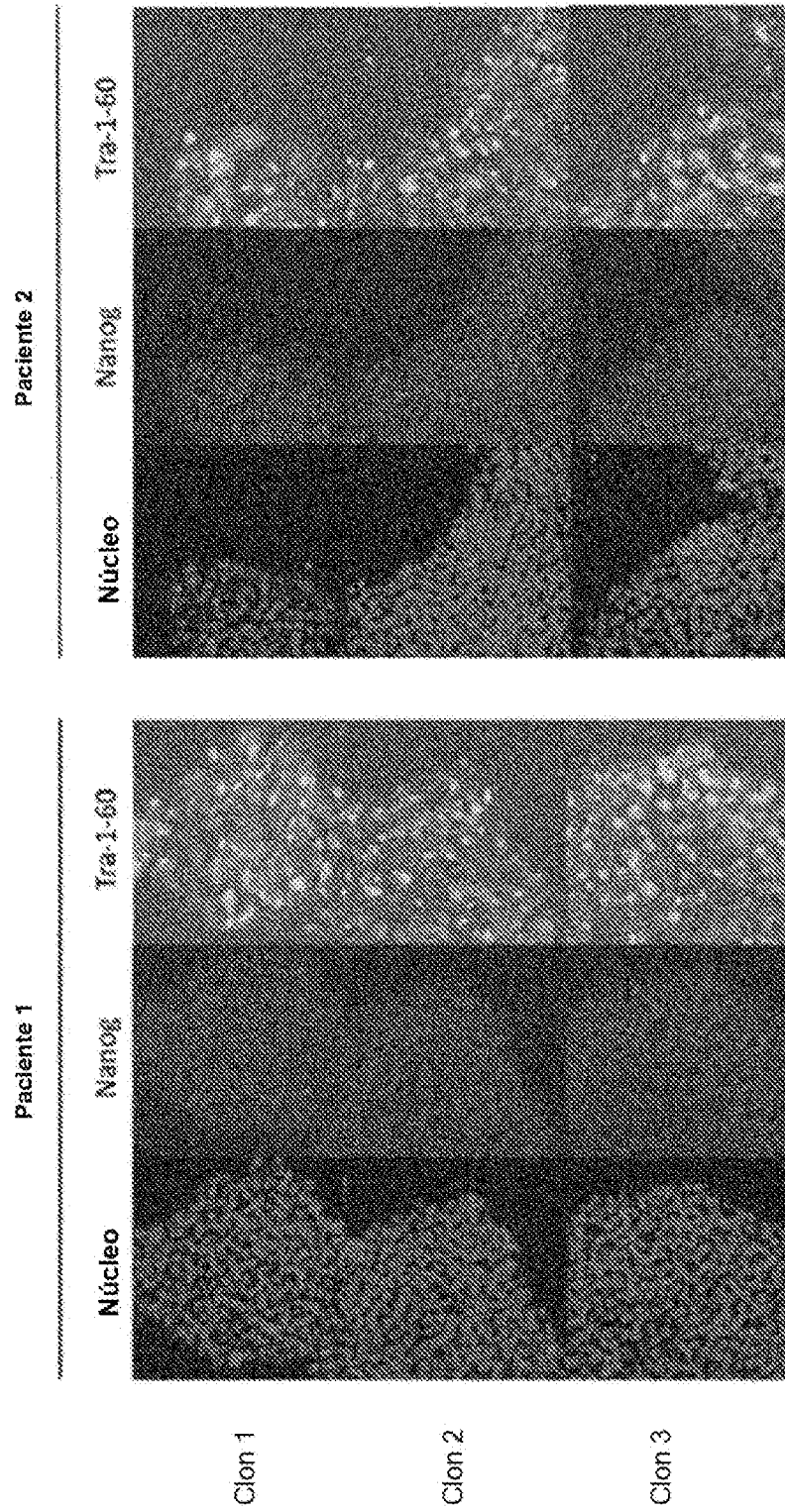


FIG. 1A(iv)

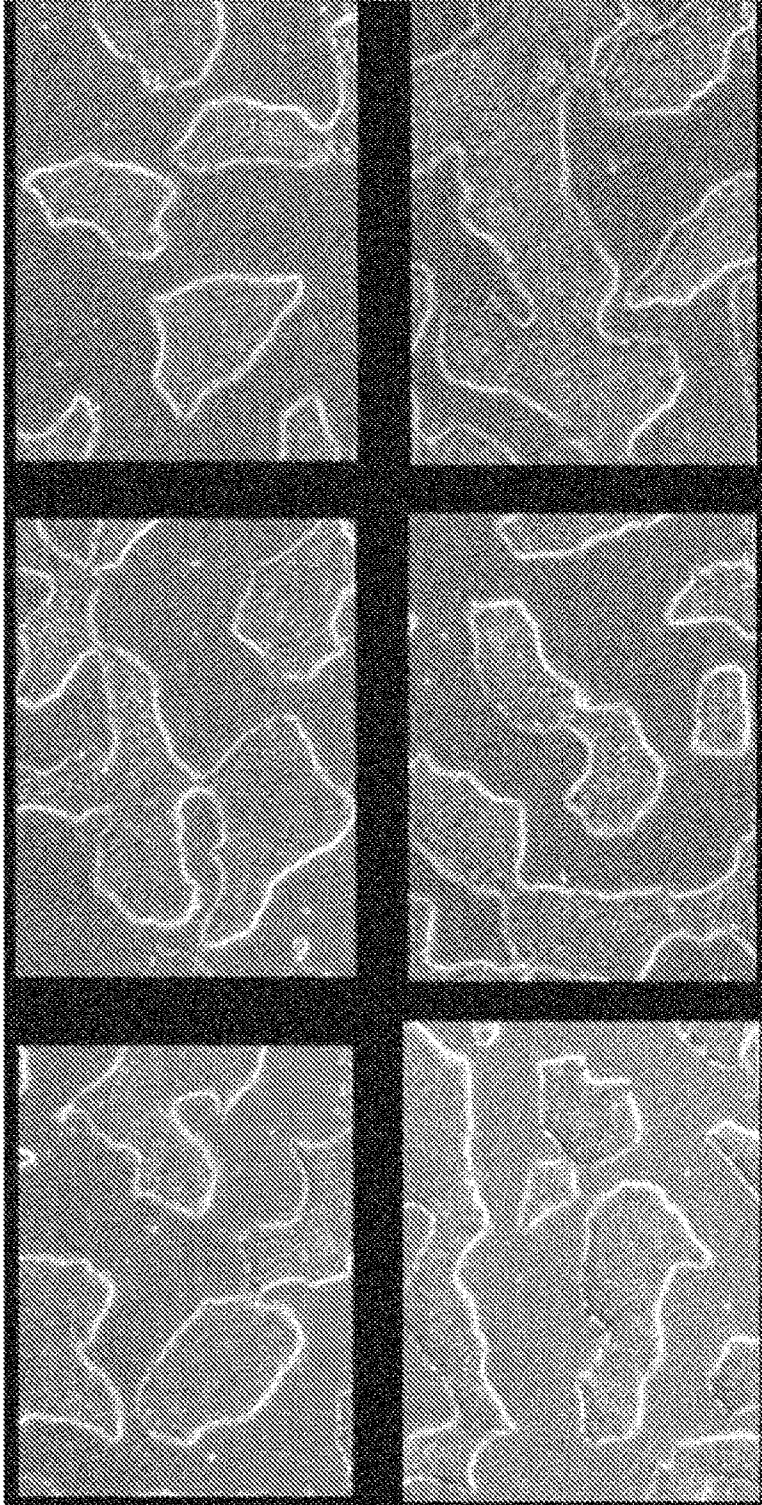


FIG. 1B(i)

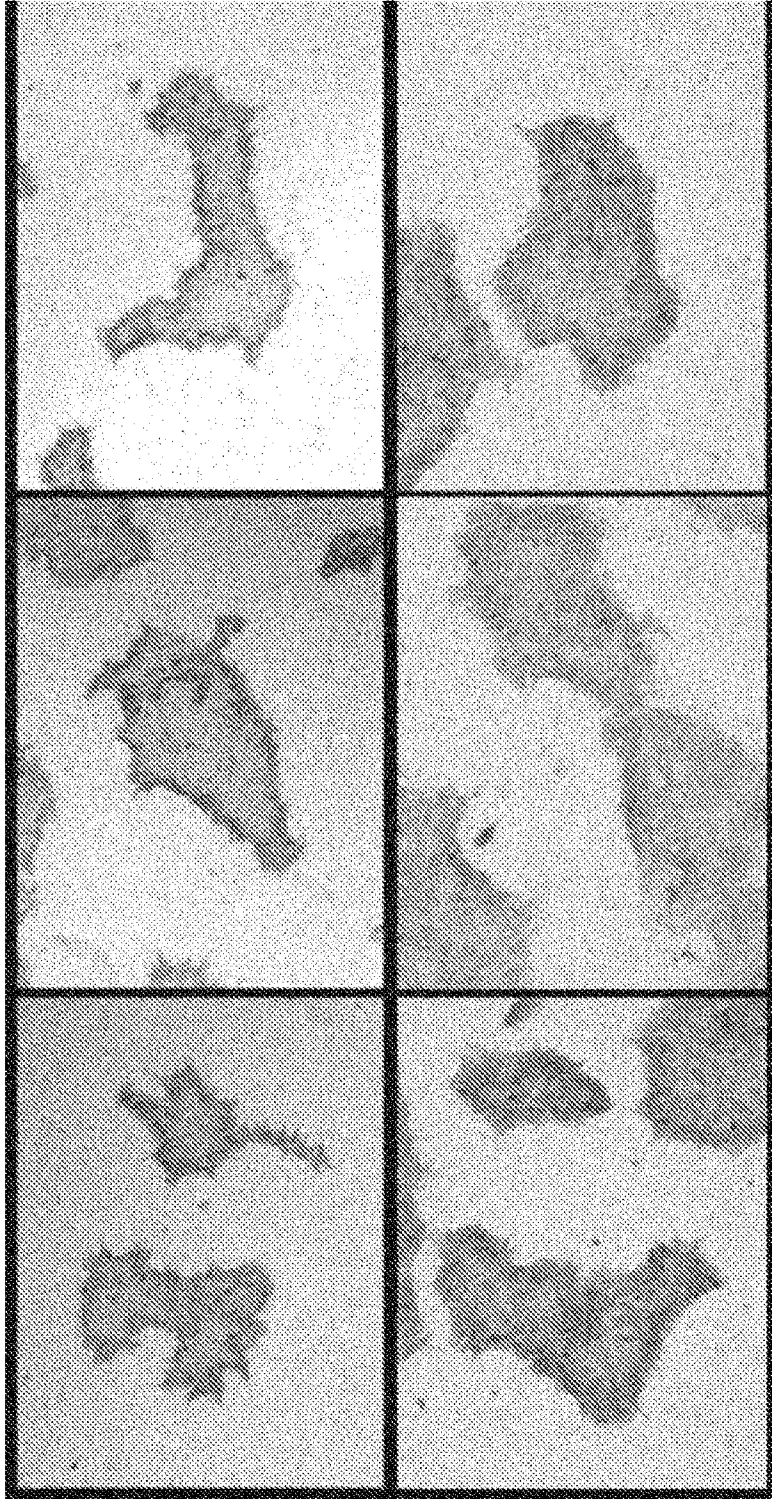


FIG. 1B(ii)

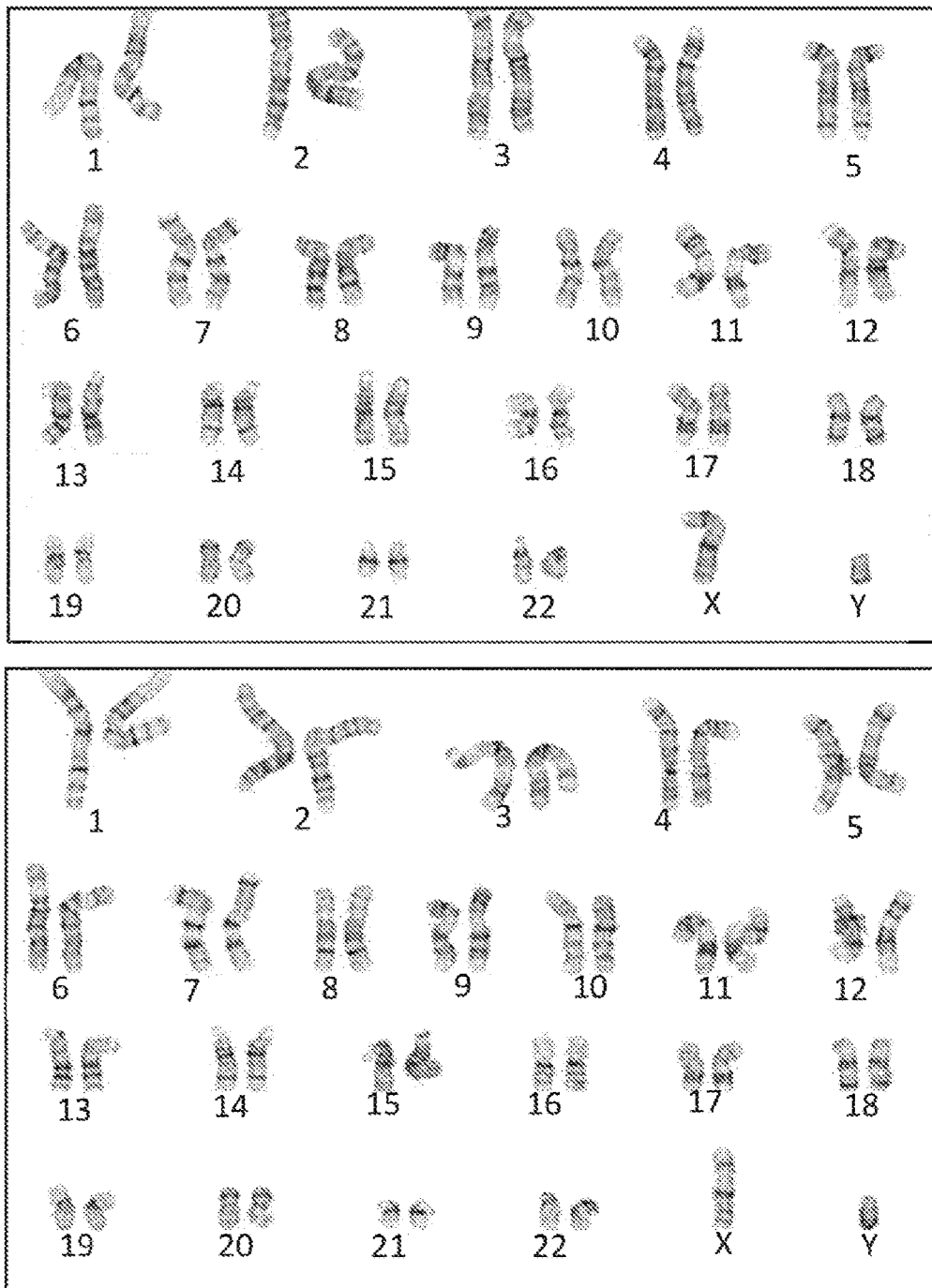


FIG. 1C

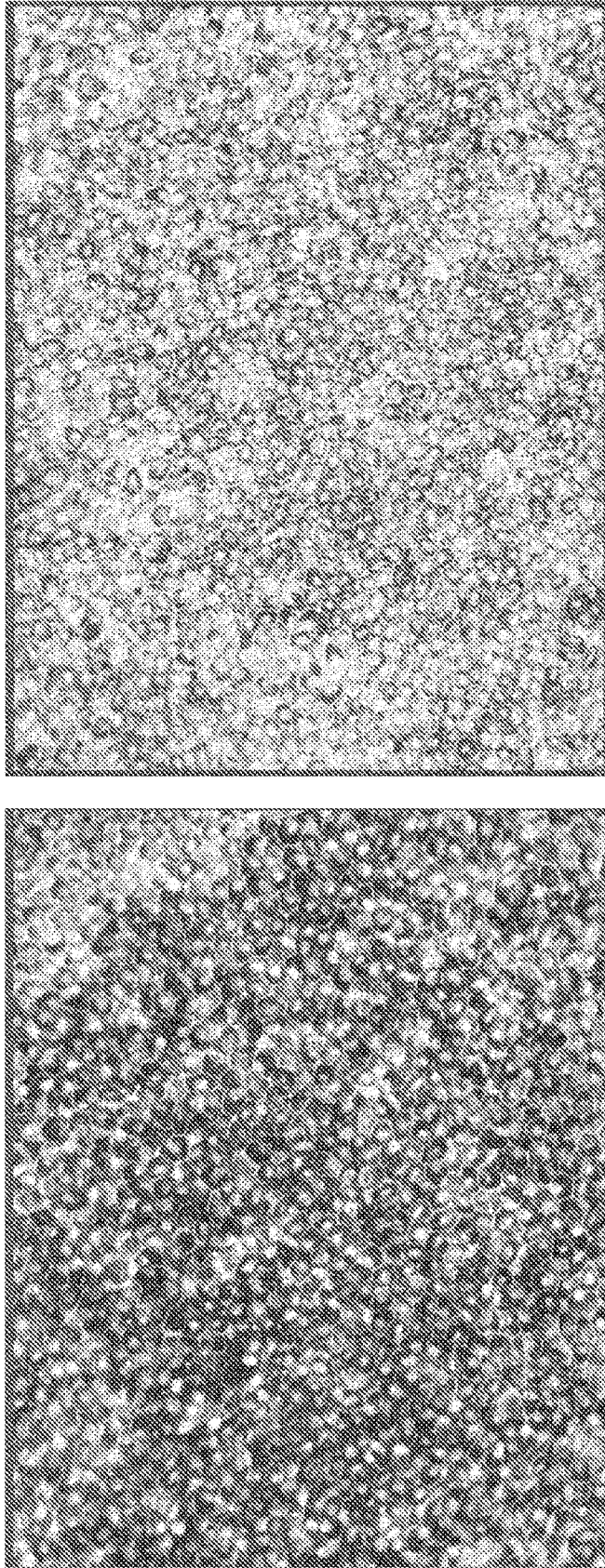


FIG. 2A(i)

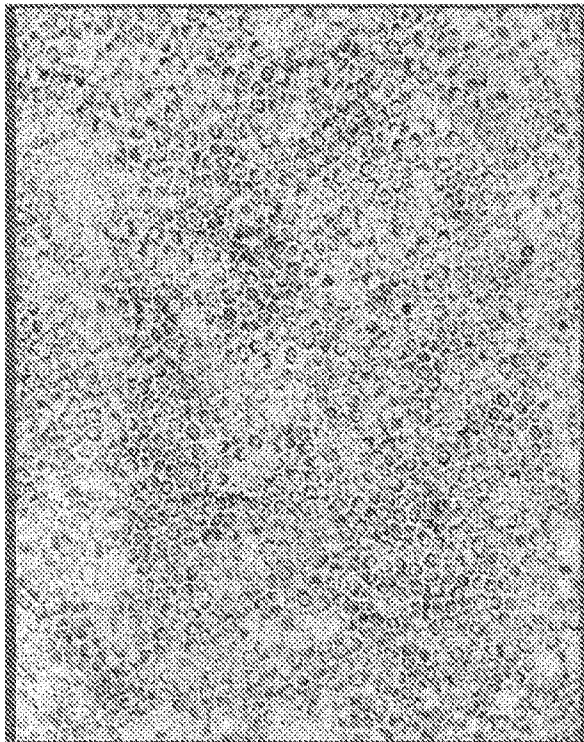
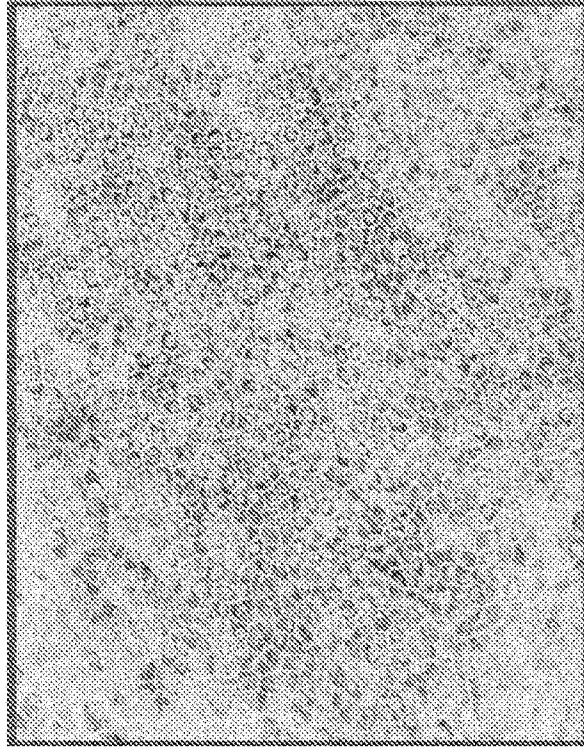


FIG. 2A(ii)

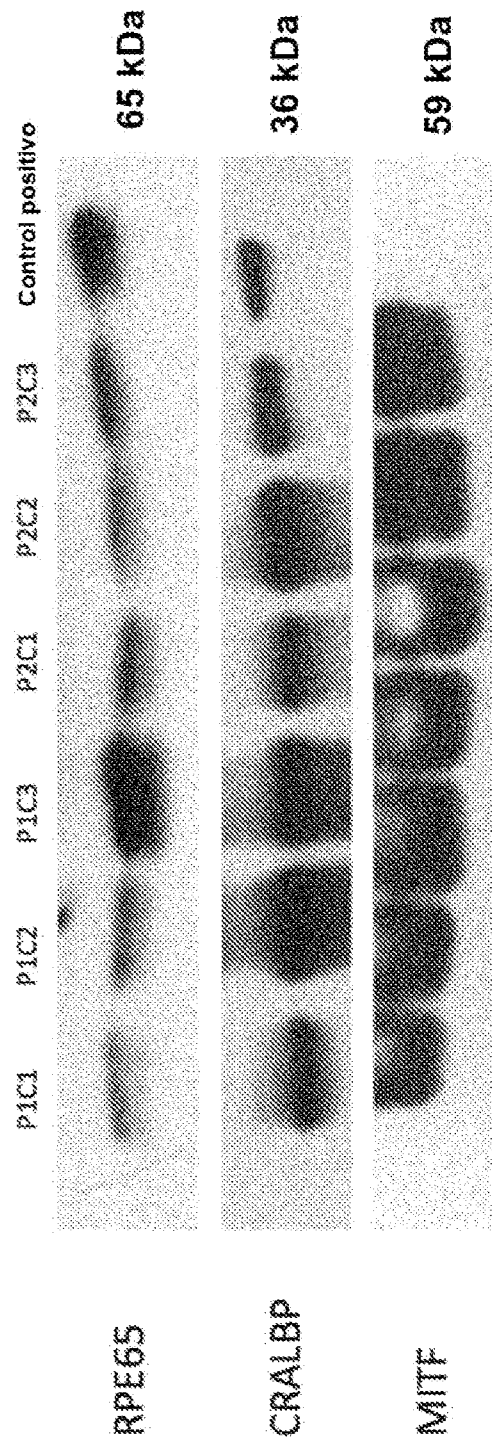


FIG. 2B

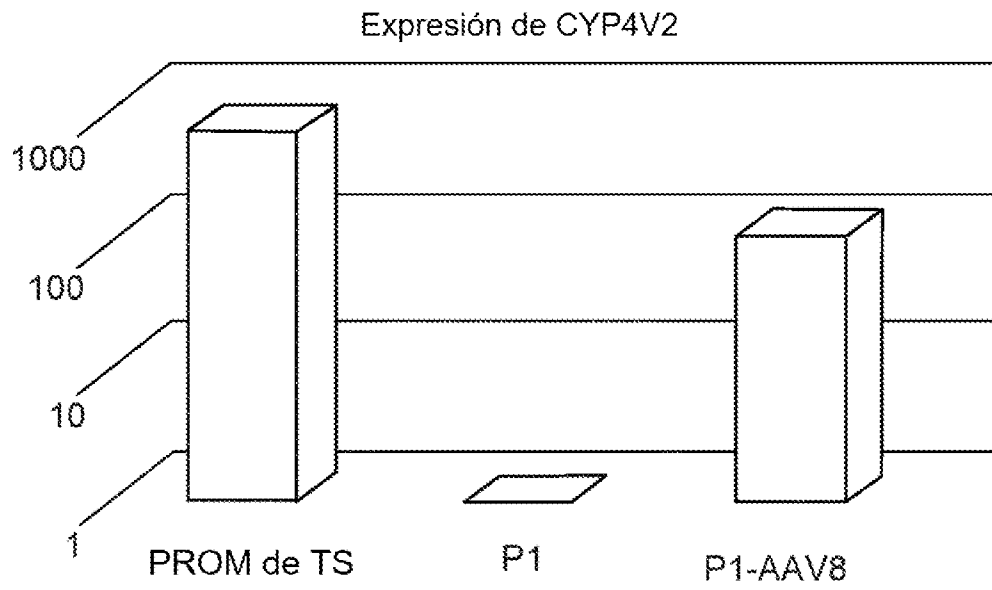


FIG. 3

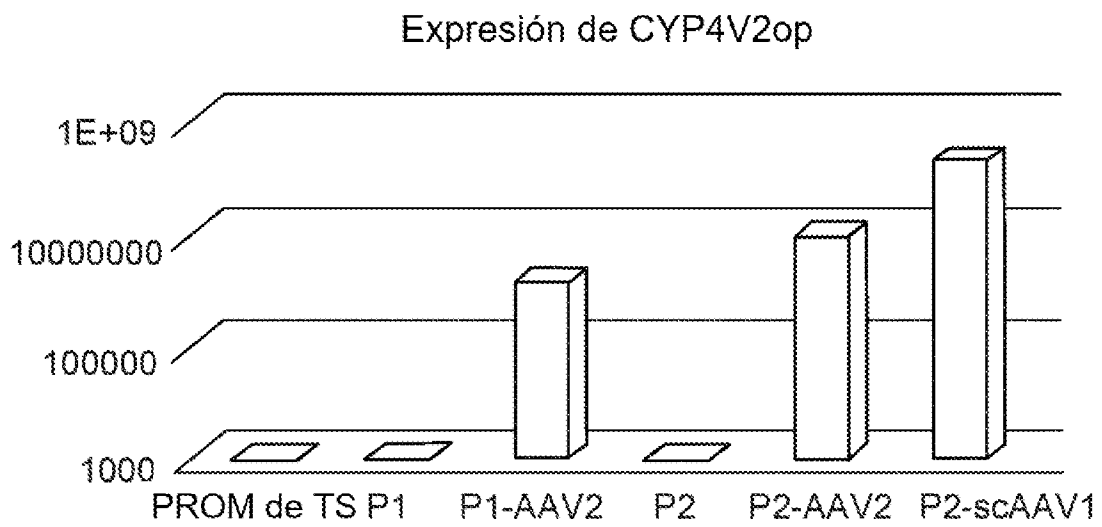


FIG. 4

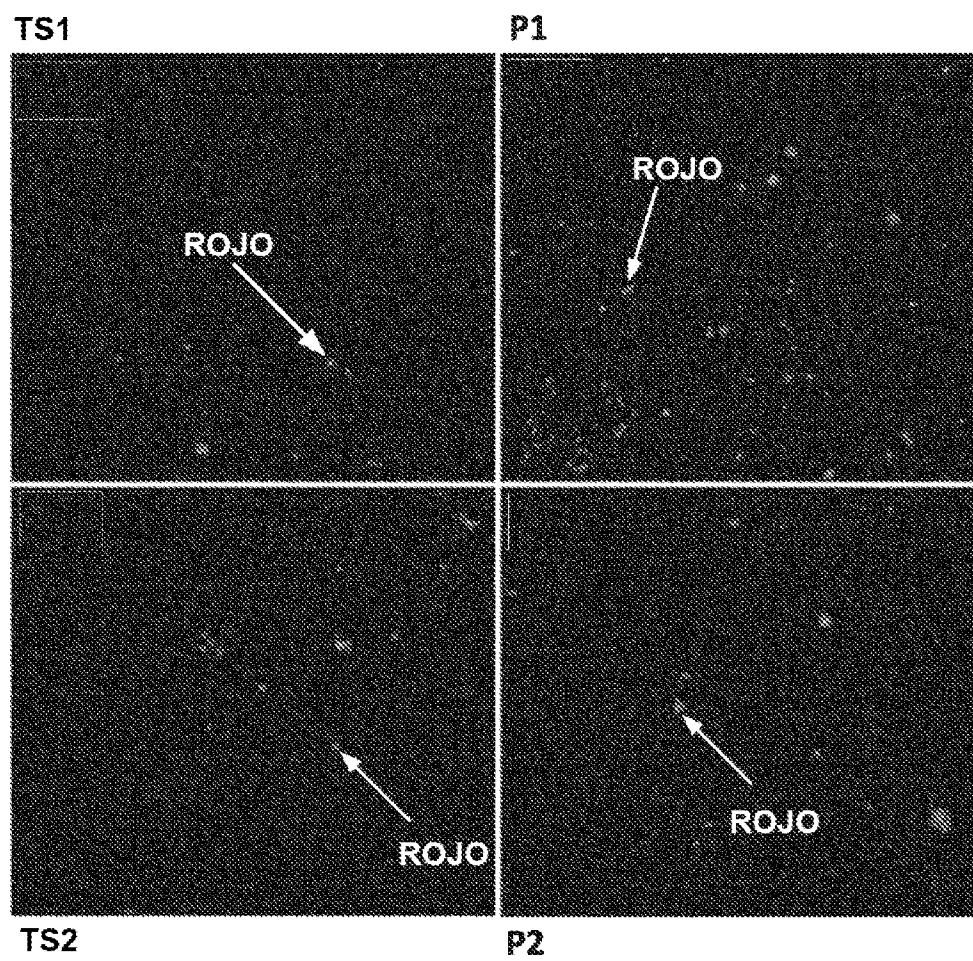


FIG. 5A

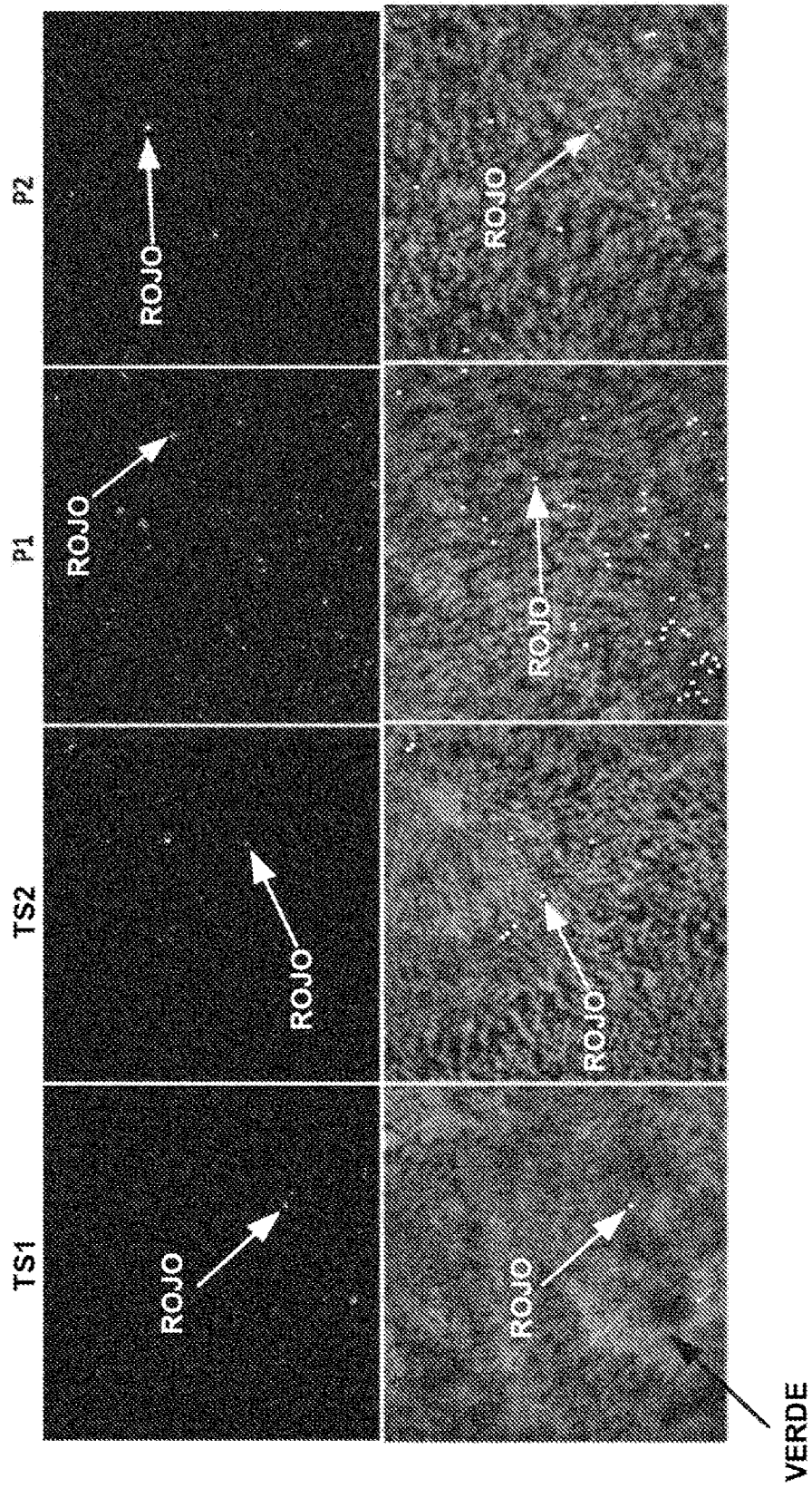


FIG. 5B

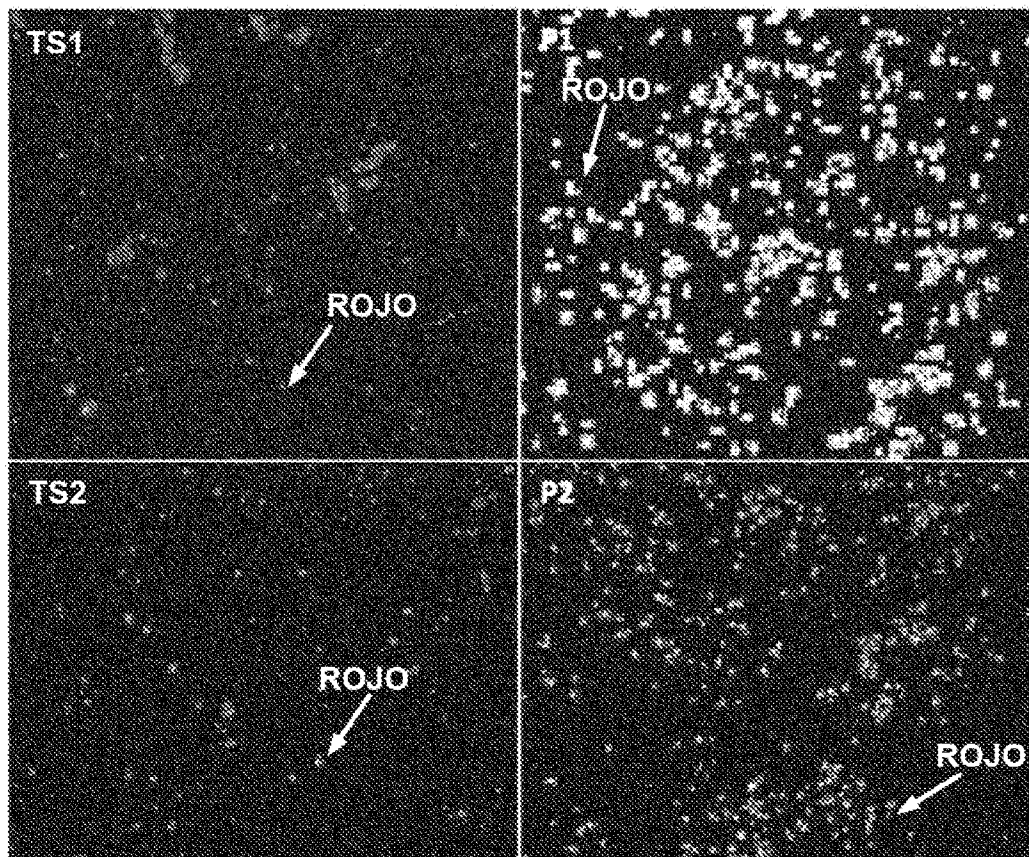


FIG. 6A

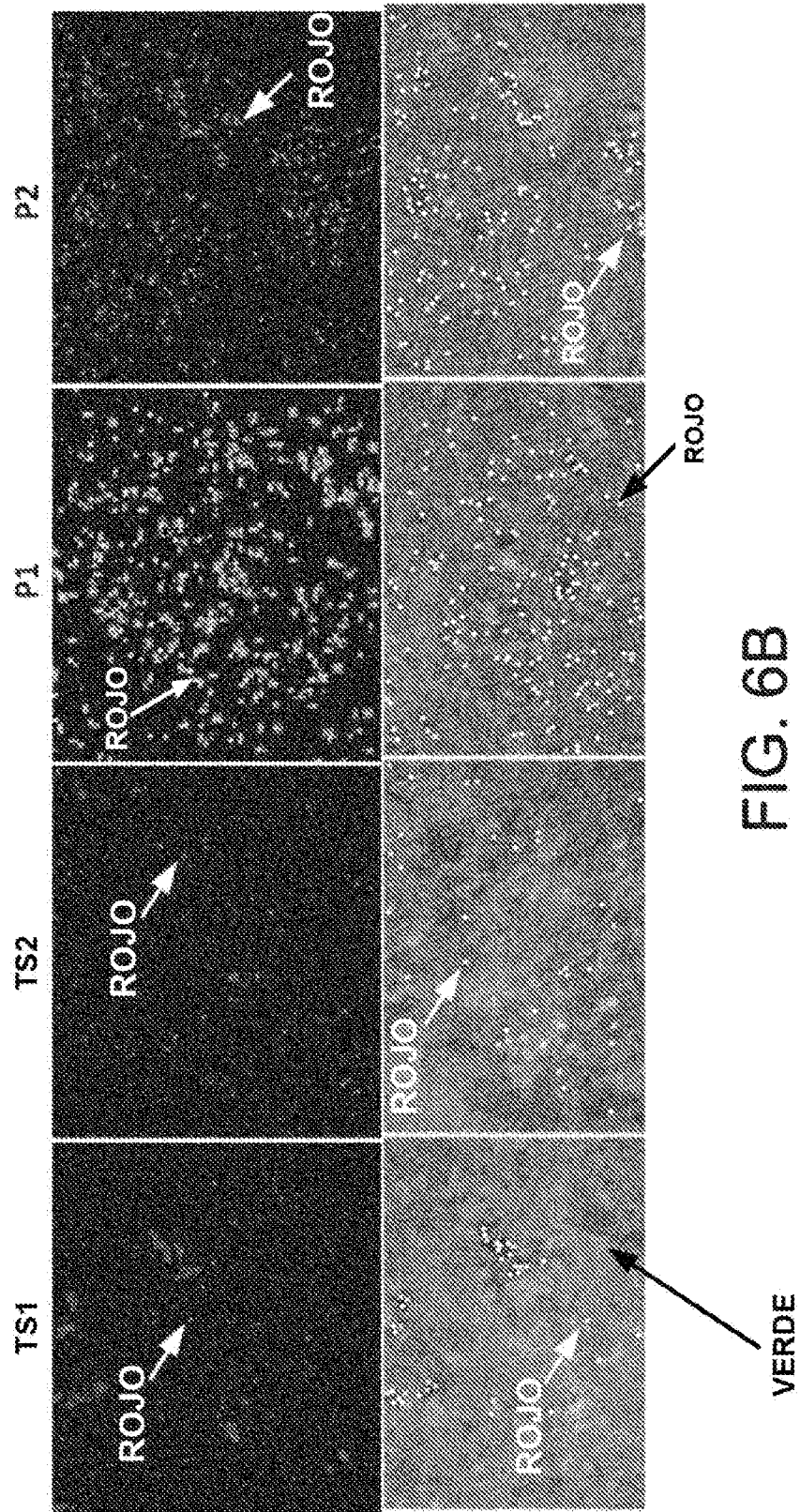


FIG. 6B

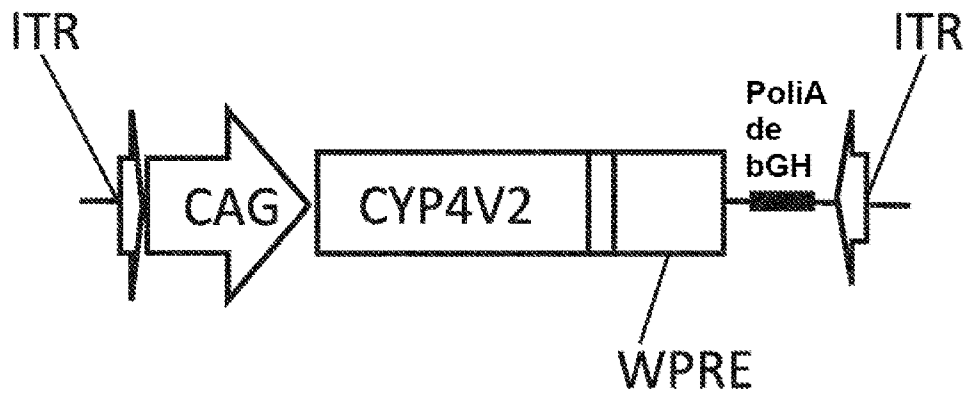


FIG. 7A

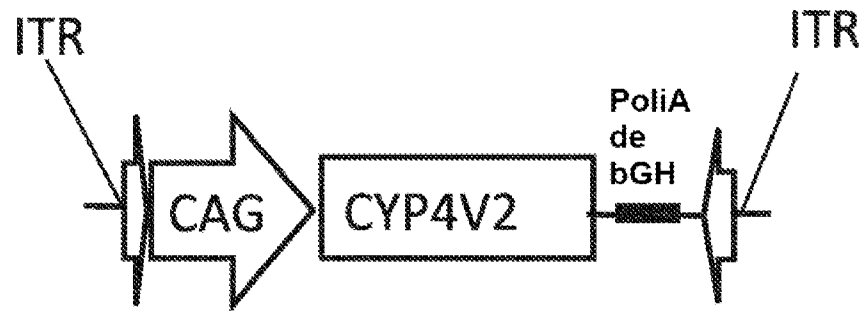


FIG. 7B

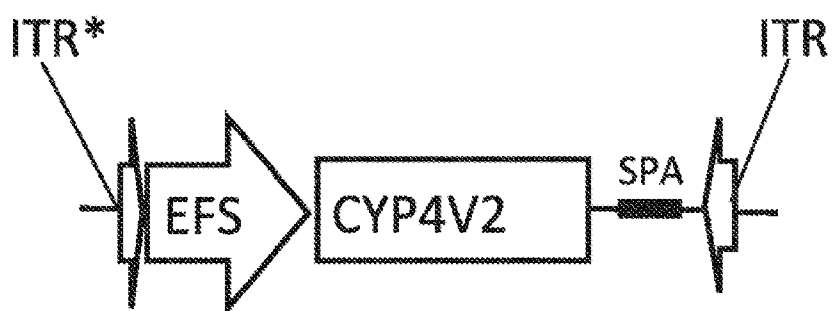


FIG. 7C

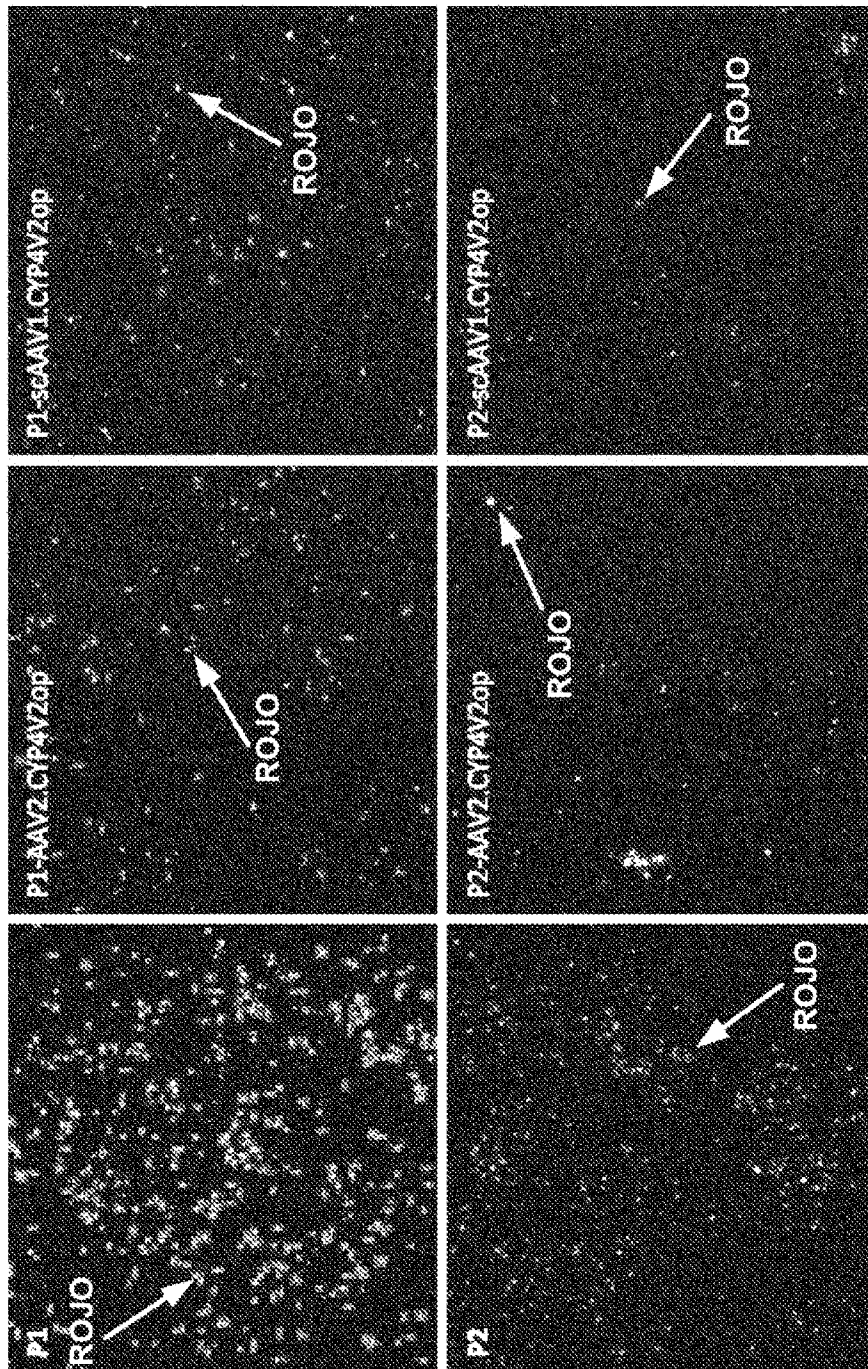


FIG. 8A

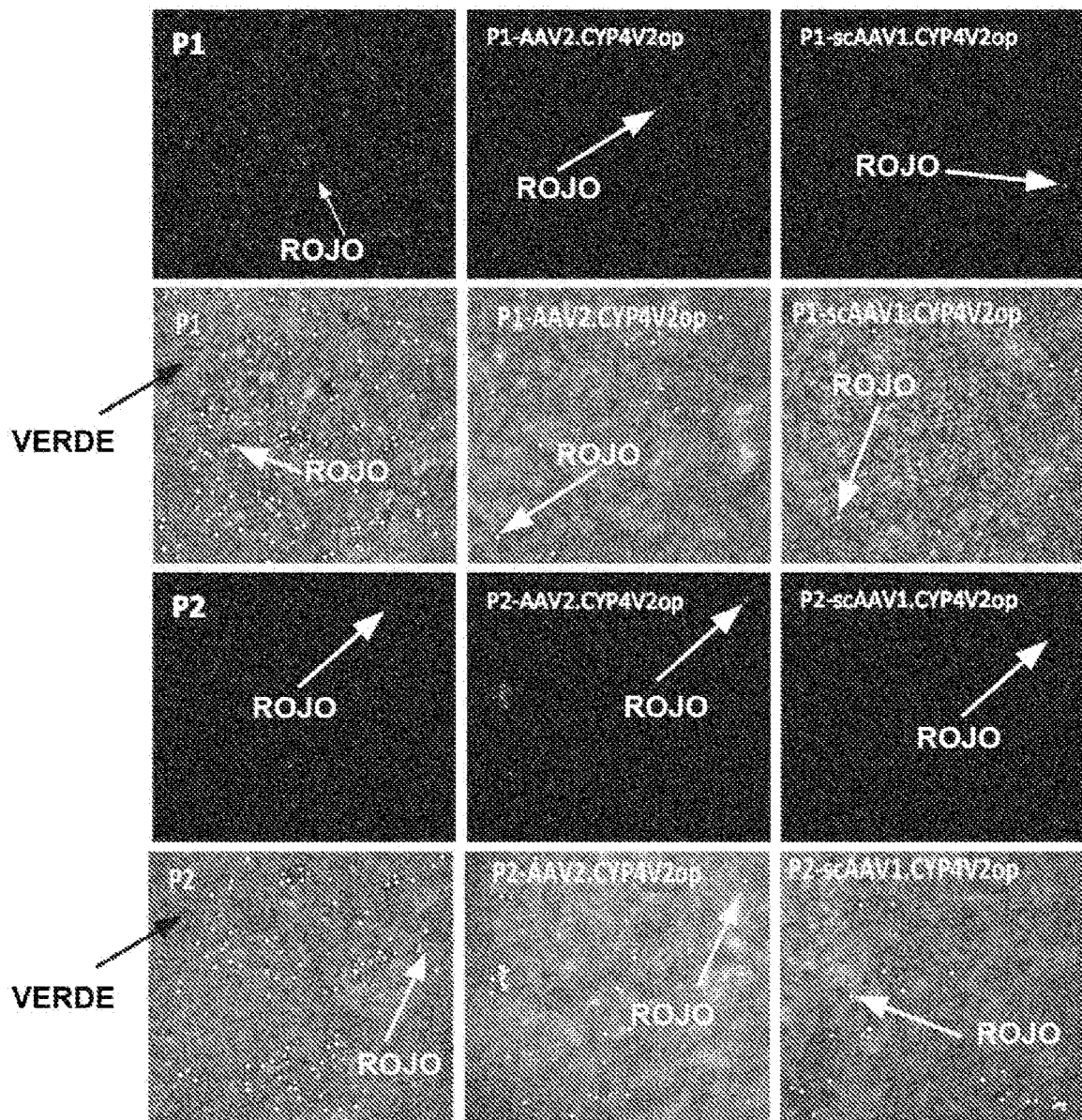


FIG. 8B

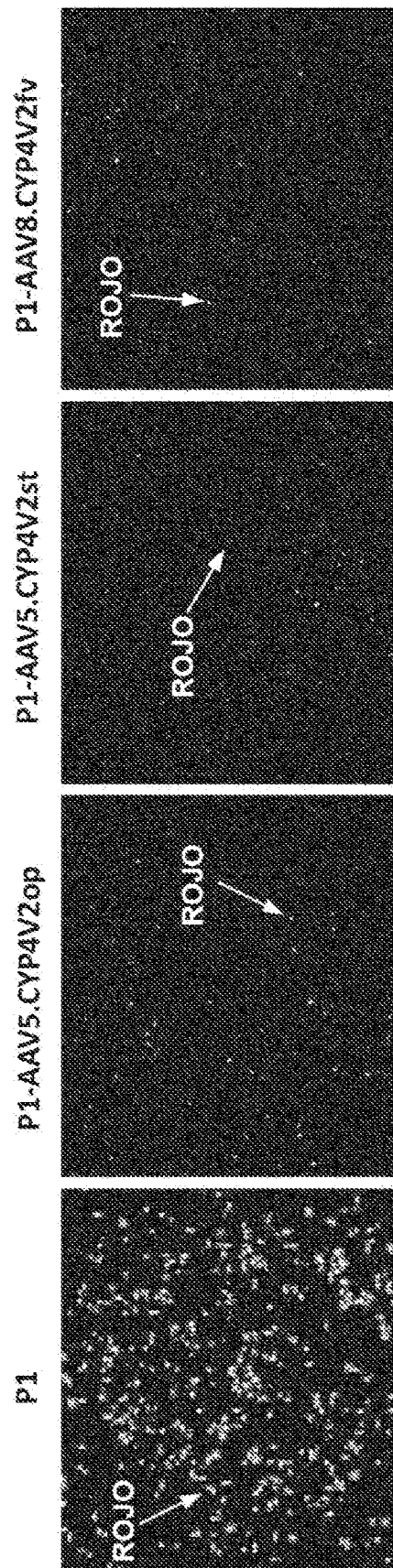


FIG. 9A

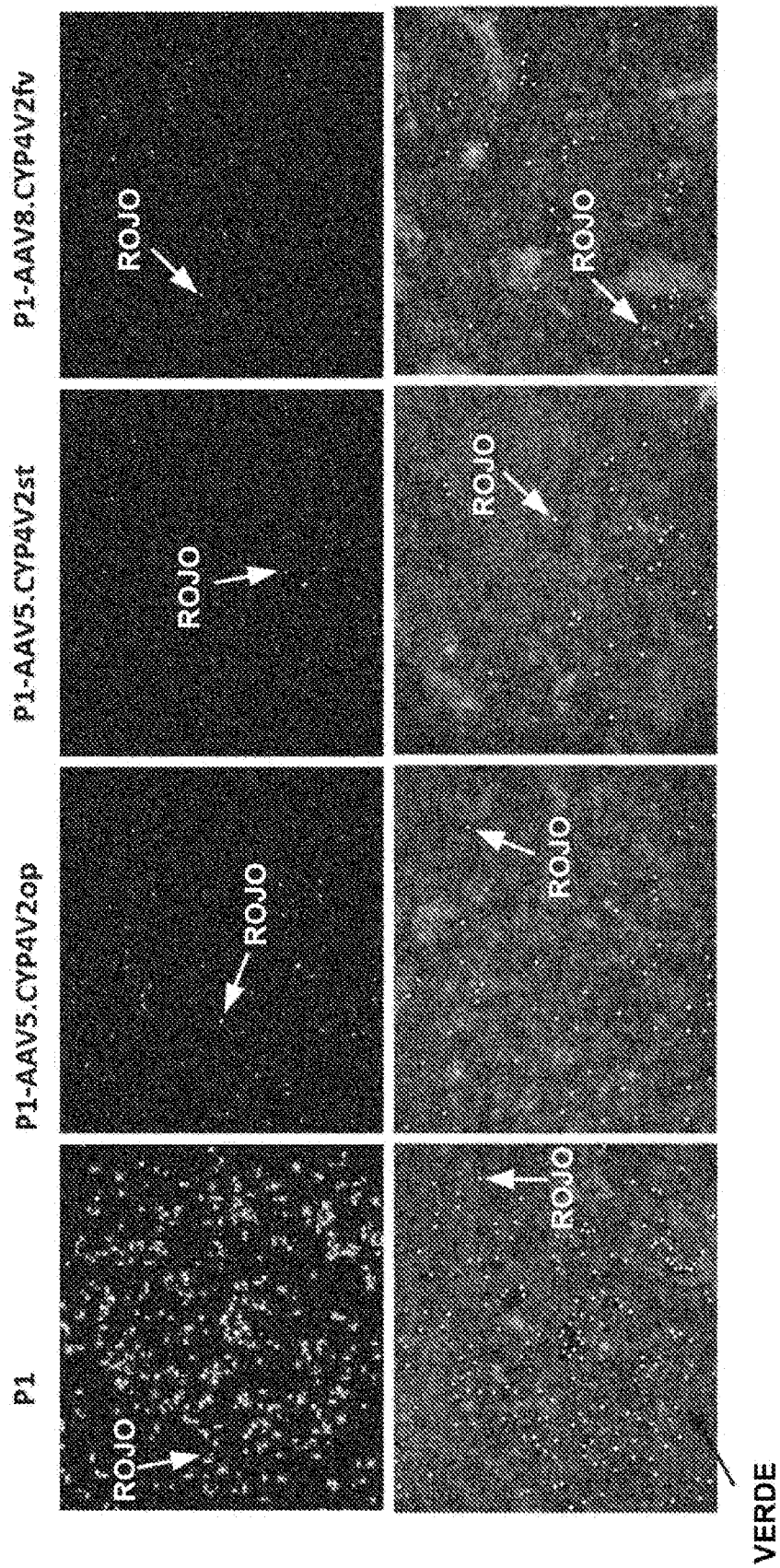


FIG. 9B

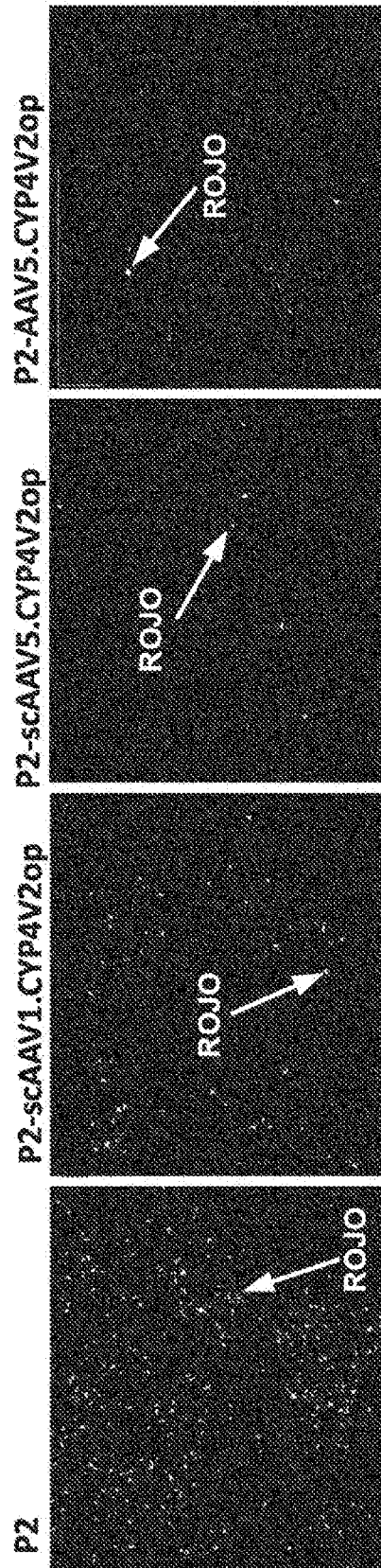


FIG. 10A

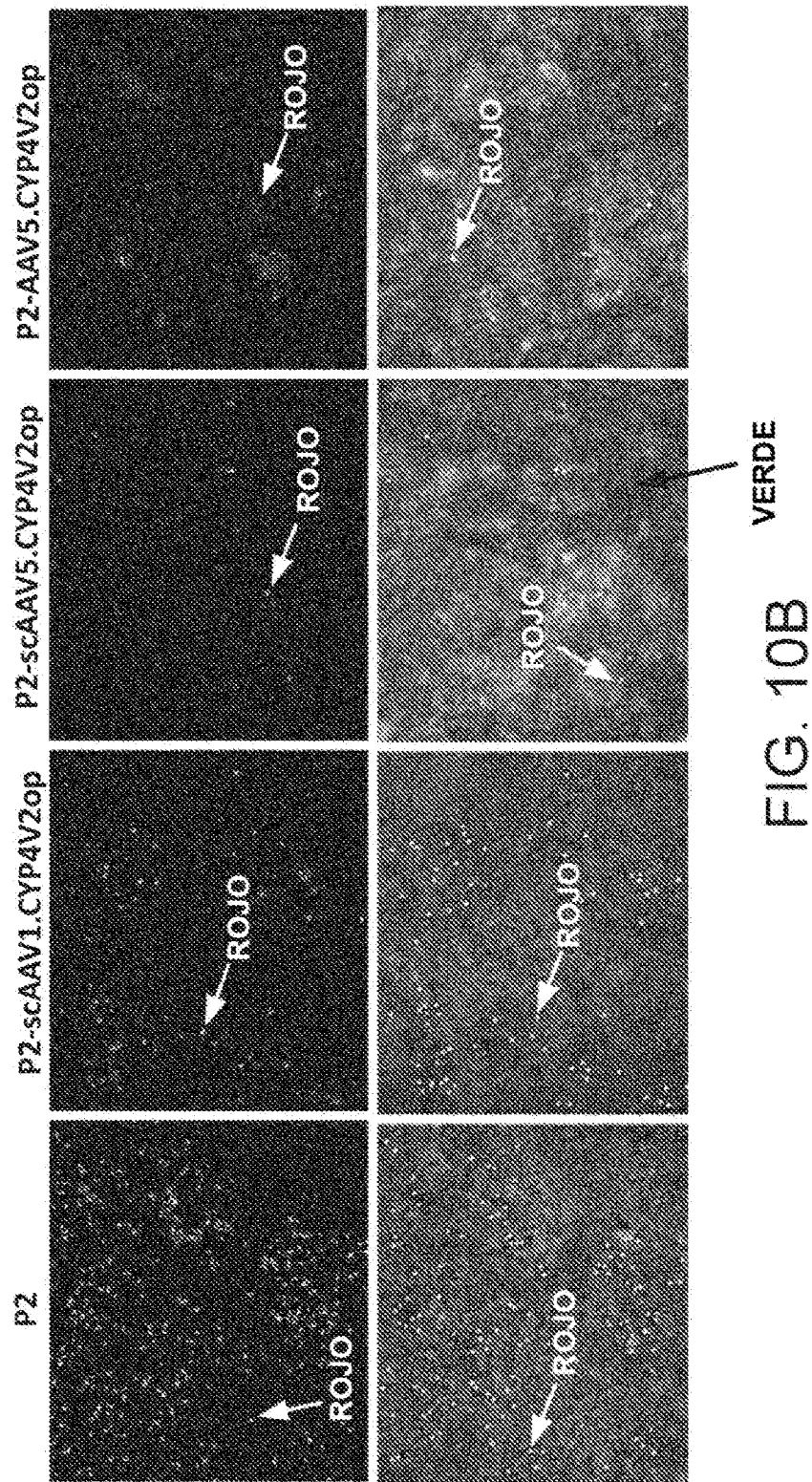


FIG. 10B

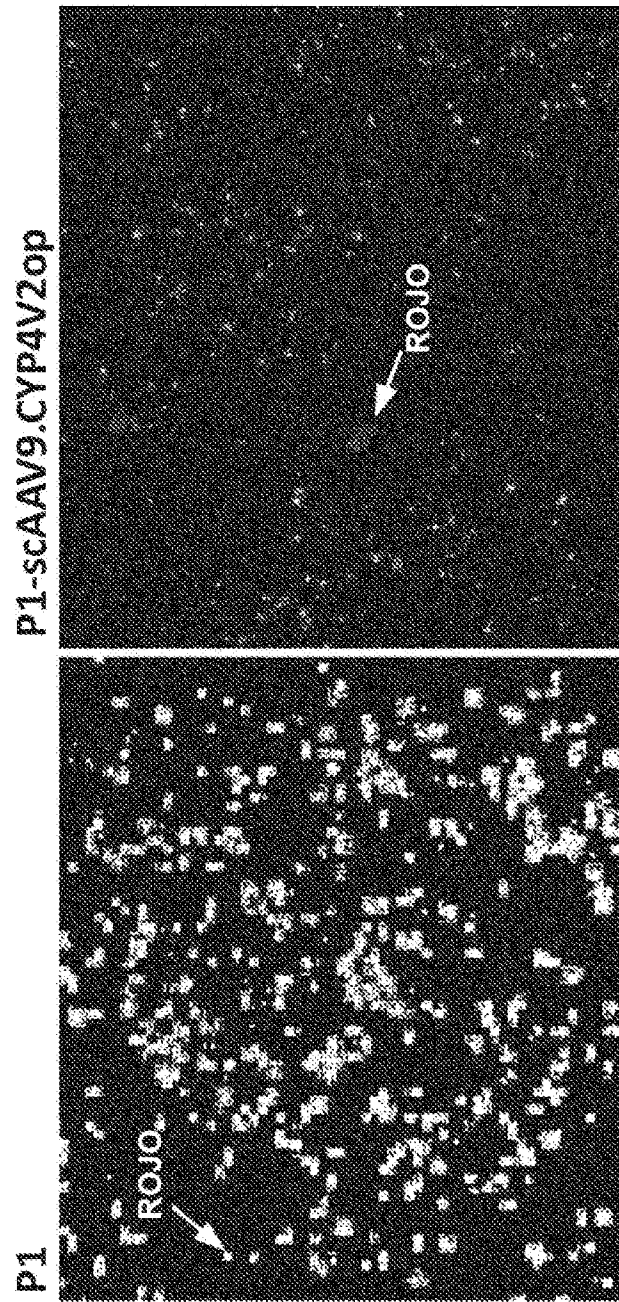


FIG. 11A

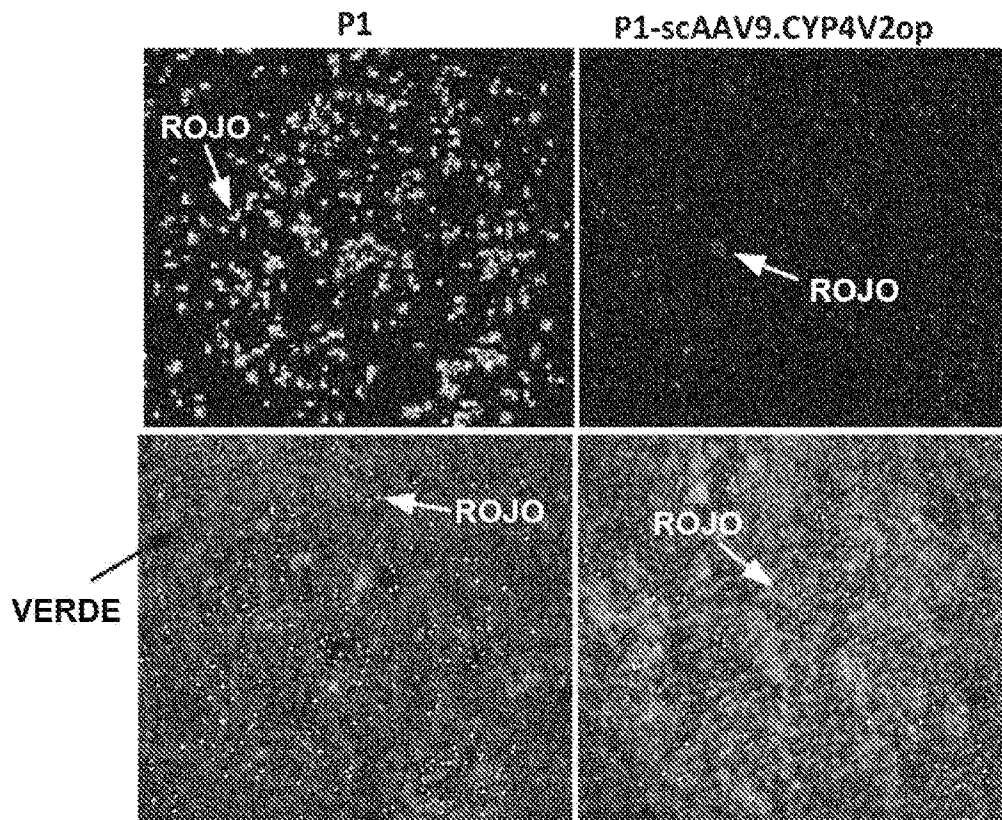


FIG. 11B

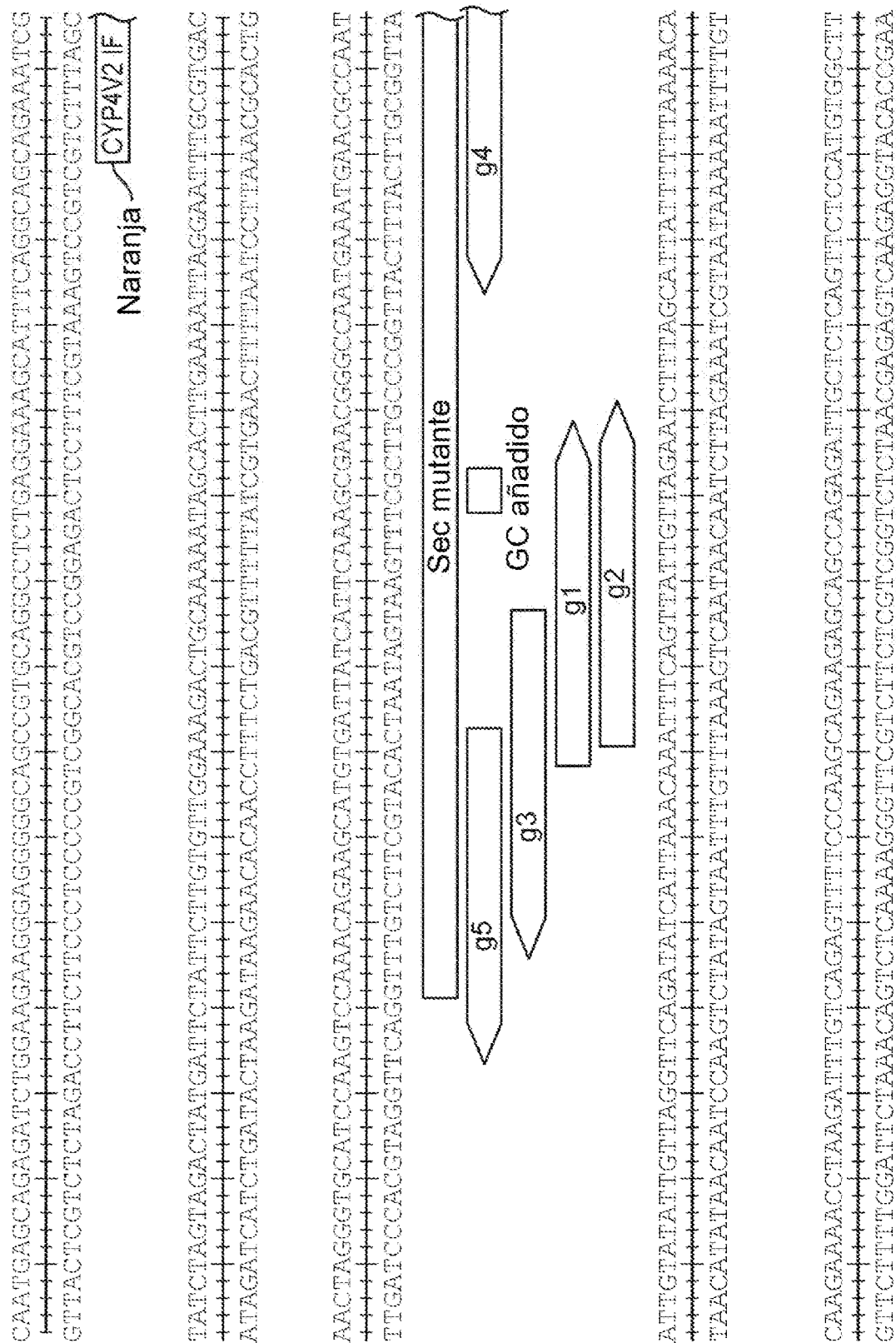
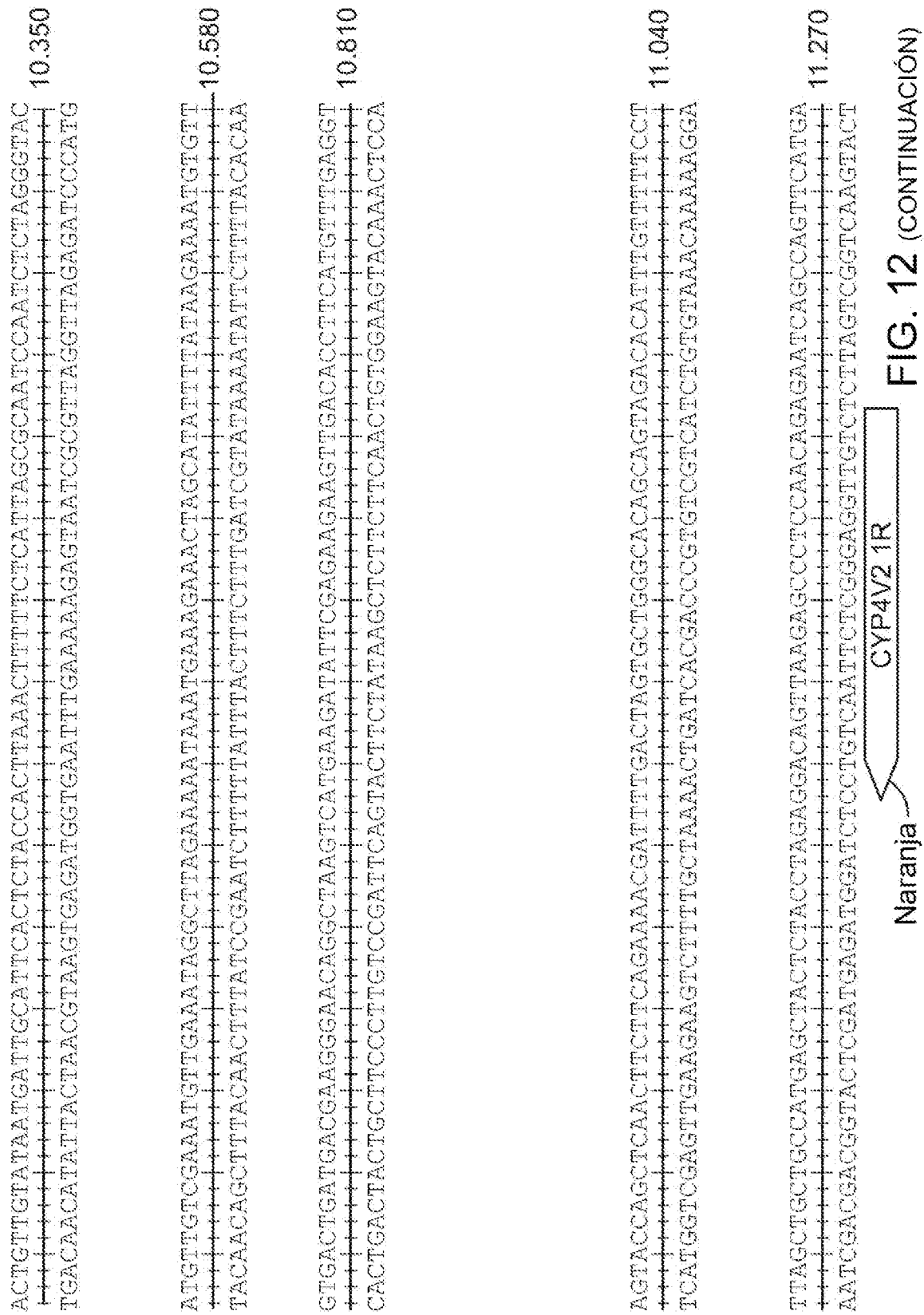


FIG. 12

CAAGCATAGAGGGTGAATTCACATAATCTGCTTGGCTTTCTTTCTCCTCTACAACATGTAATTAAGTCATATAATTAG
 GFTCGTATCTCCCACTTAAAGTGAATTAGACGAACGACAAAGAAAGAGGAGATGTTGTACATTAATTACAGATATTAATC
 } CYP4V2 1F
 Naranja
 ATTAATTTGTTTTTAAAGTTTCACCAGATAATCCCCAAATAATTAATGAGGCTTTACTGTATTTCACAAGAGCCT
 TAATTTAAACAAAAATTTTCAAAGTGGTCTATTAGGGGTTTTATATAATTACTCCGAAATGACATAAAAGTGTCTCTCGGA
 GAAGACTGTAGAGGTGATGGCAGGGGCTCTGCCCCCTCCAAAAATAAACGCCAGGGCCTTCTTGACTTGCTTTTAAAGT
 CTCTGACATCTCCACTACCGTCCCCGAGACGGGGCAGGTTTTTATTTGCGTCCCGAAAGAACTGAACGAAAAATTCA
 } 94
 ATCAAATTTAAGTAGTTTAACTAAAGAAGATTCAATTATATTTAATTAGAAATTACAAAATTAAAGAACTGATTA
 TAGTTTAAAAATTTCAATCAAATTGATTTCTCTAAGTAATAAAAAATTAATCTTTAATGTTTTTAAATCTTTGACTAAT
 CAGGCTTCCTTCTAACTCCAGACATGCAAGTCCACTTCCTCACCACTGCTTTCTGAGGTTCCAGCAGATGAGCAC
 GTCCGAAGGAAGATTGGAGGGTCTGTACGTTCAGGTGAAGGAGTGGTGGACGAAAGACTCCAGGTCGTCTACTCGTG

FIG. 12 (CONTINUACIÓN)



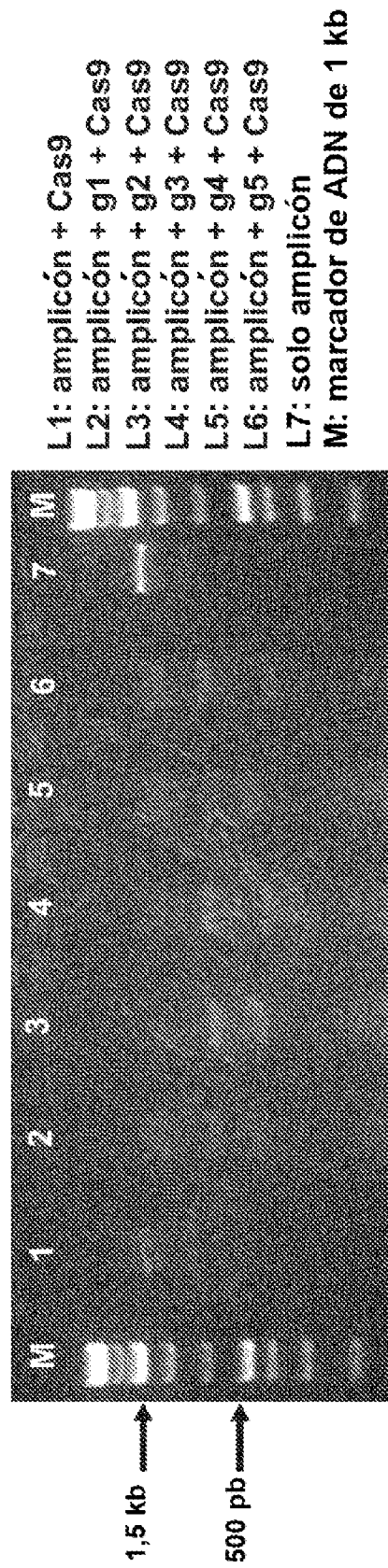
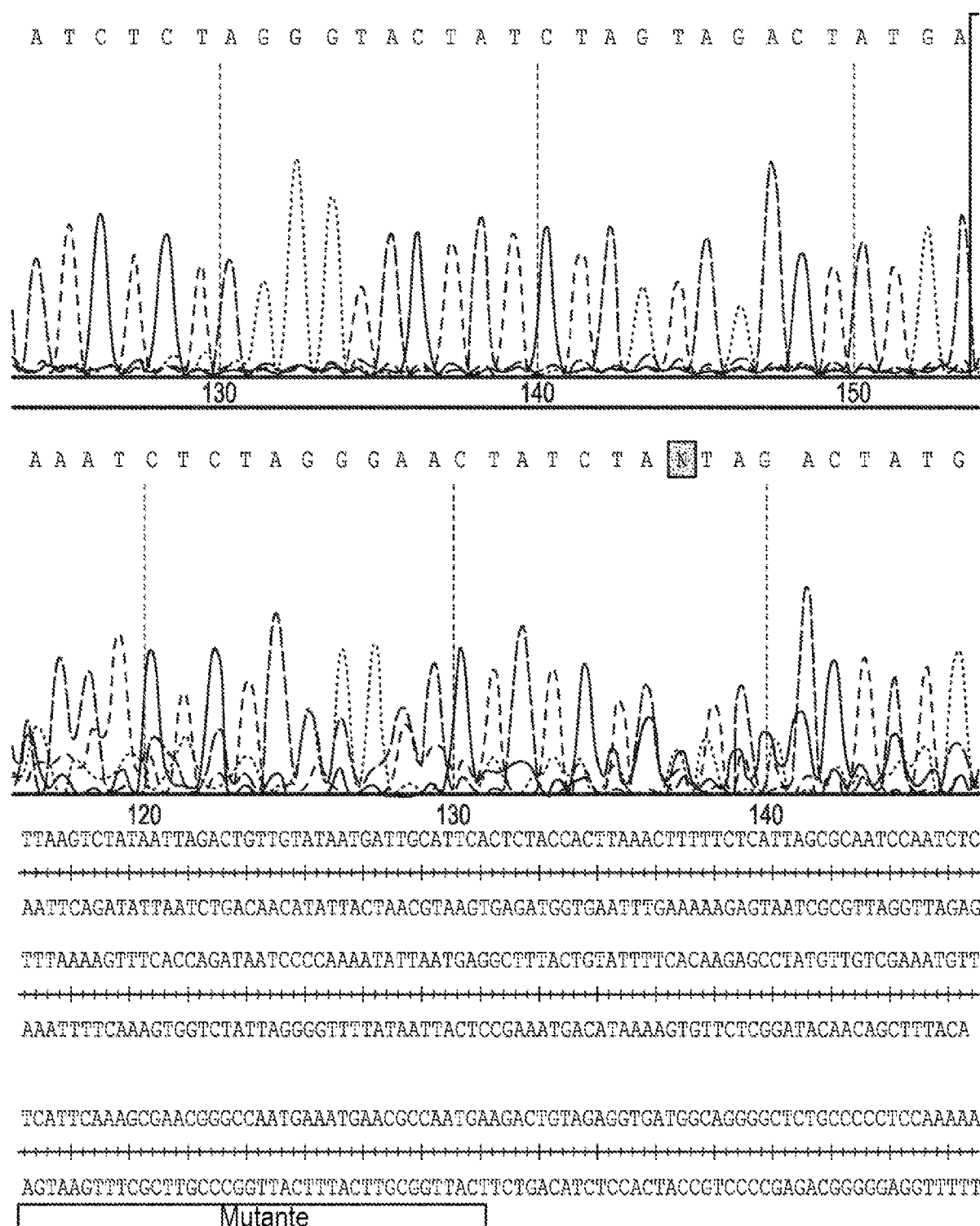


FIG. 13



GC
GC añadido

FIG. 14

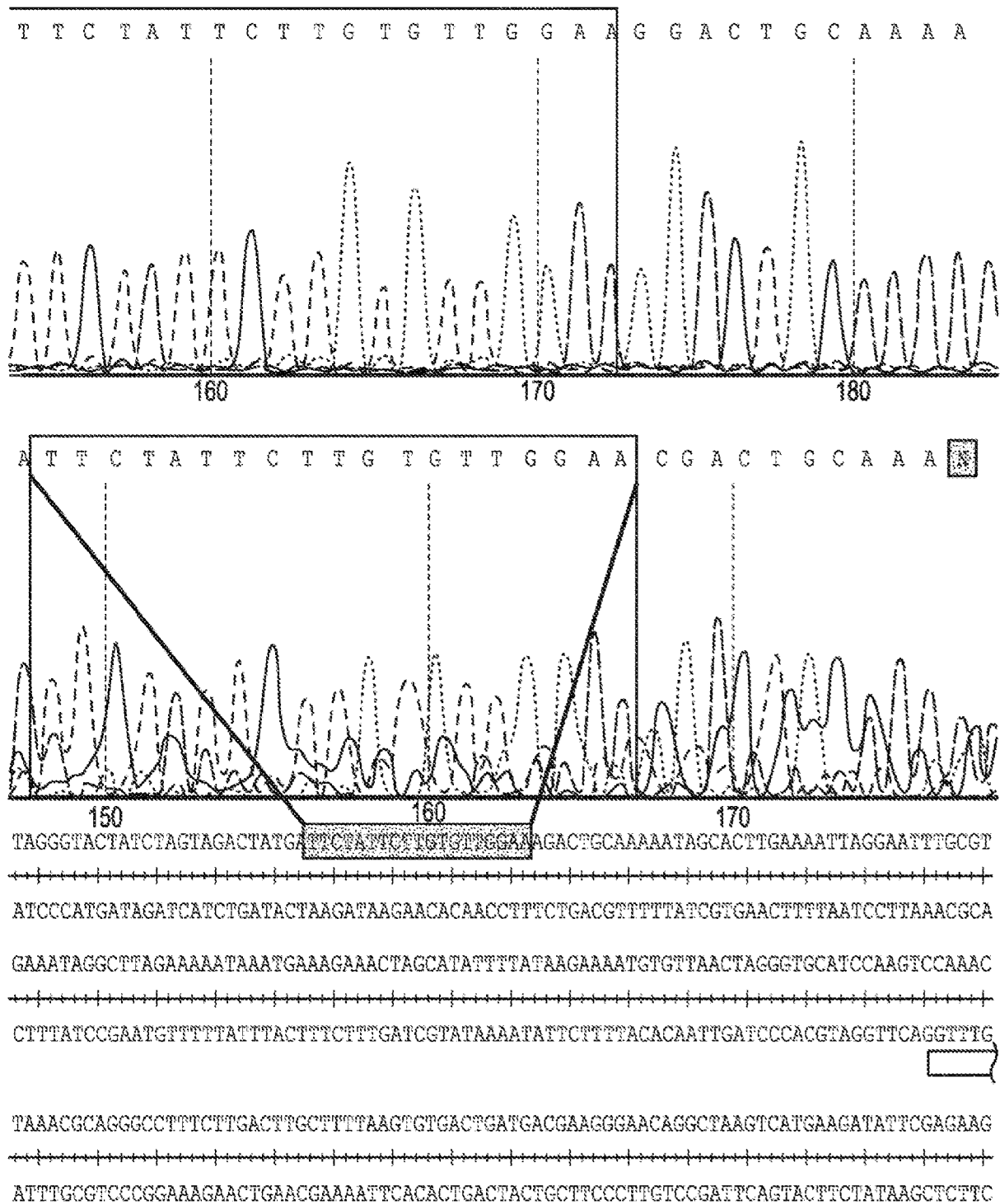


FIG. 14 (CONTINUACIÓN)

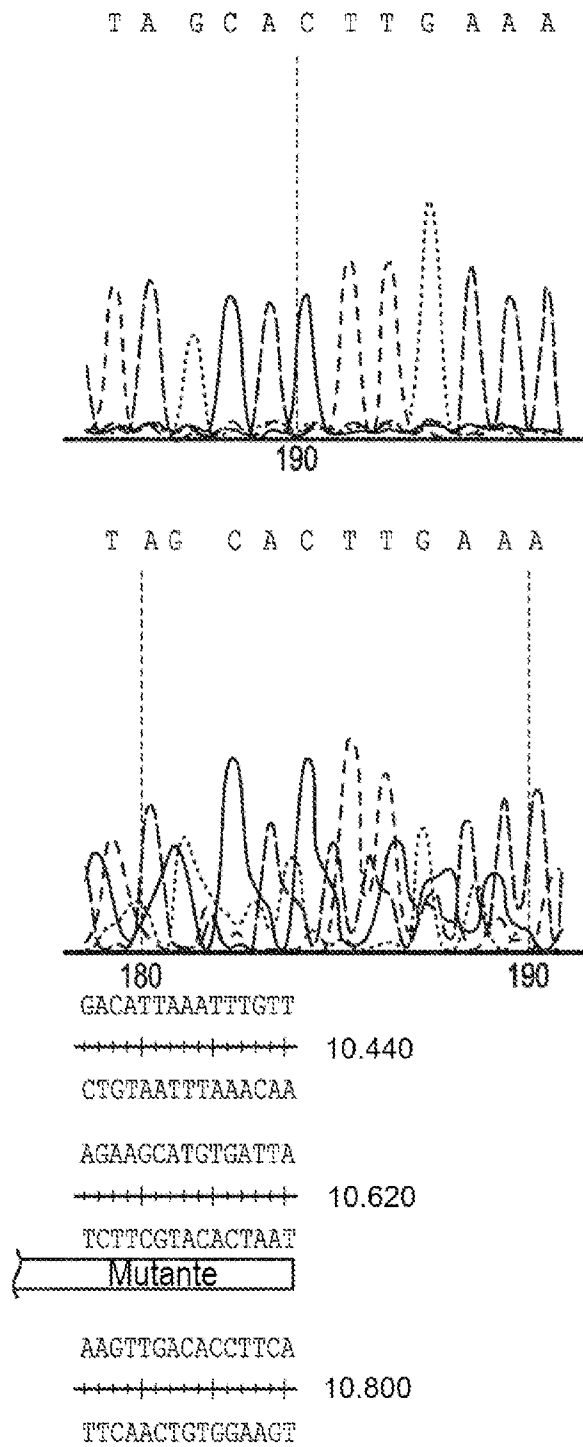
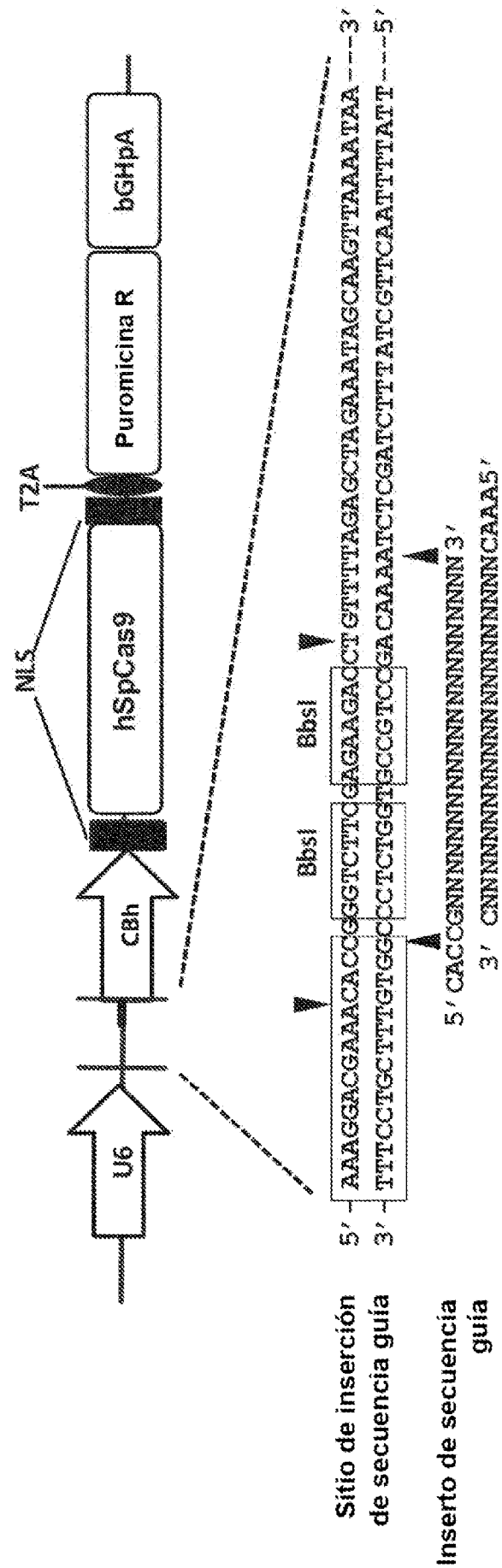


FIG. 14 (CONTINUACIÓN)



51
G
E

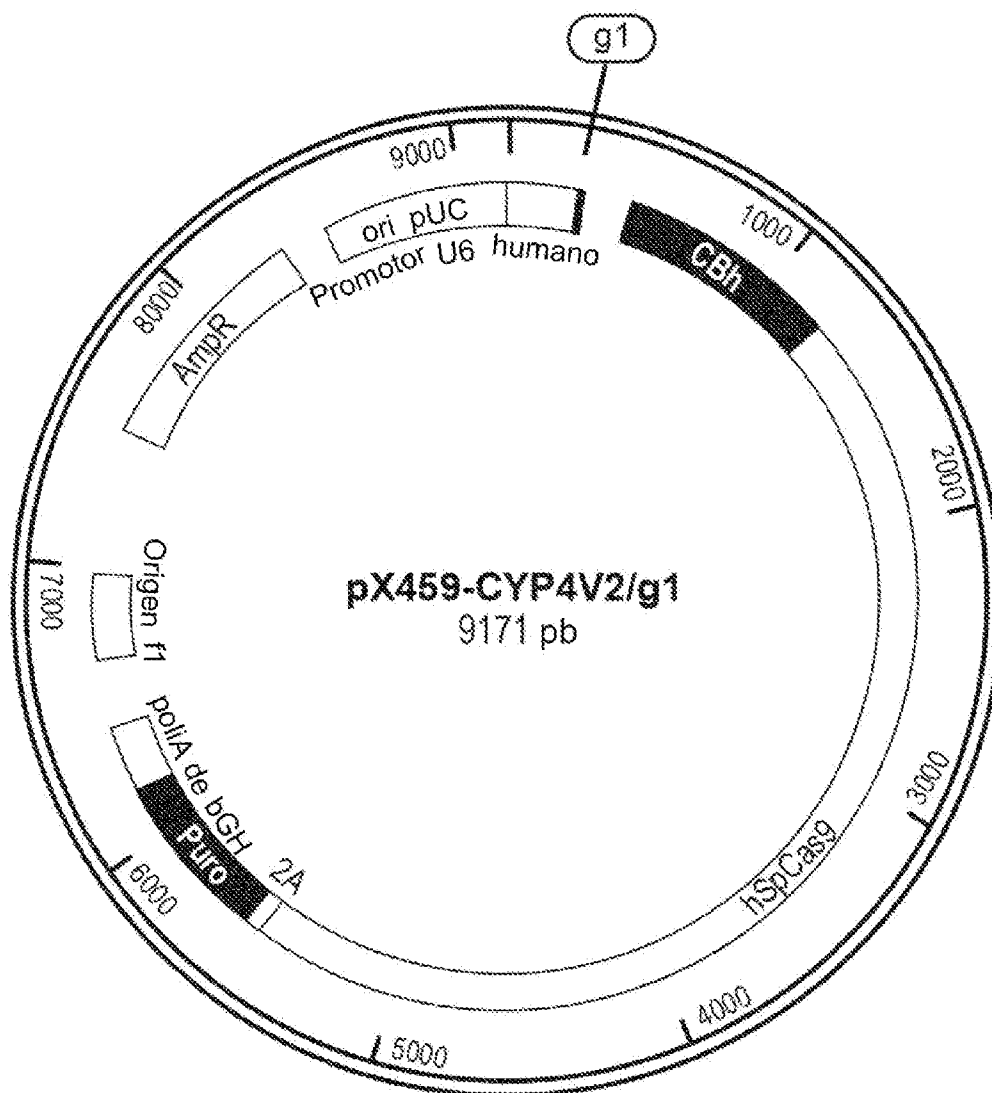


FIG. 16

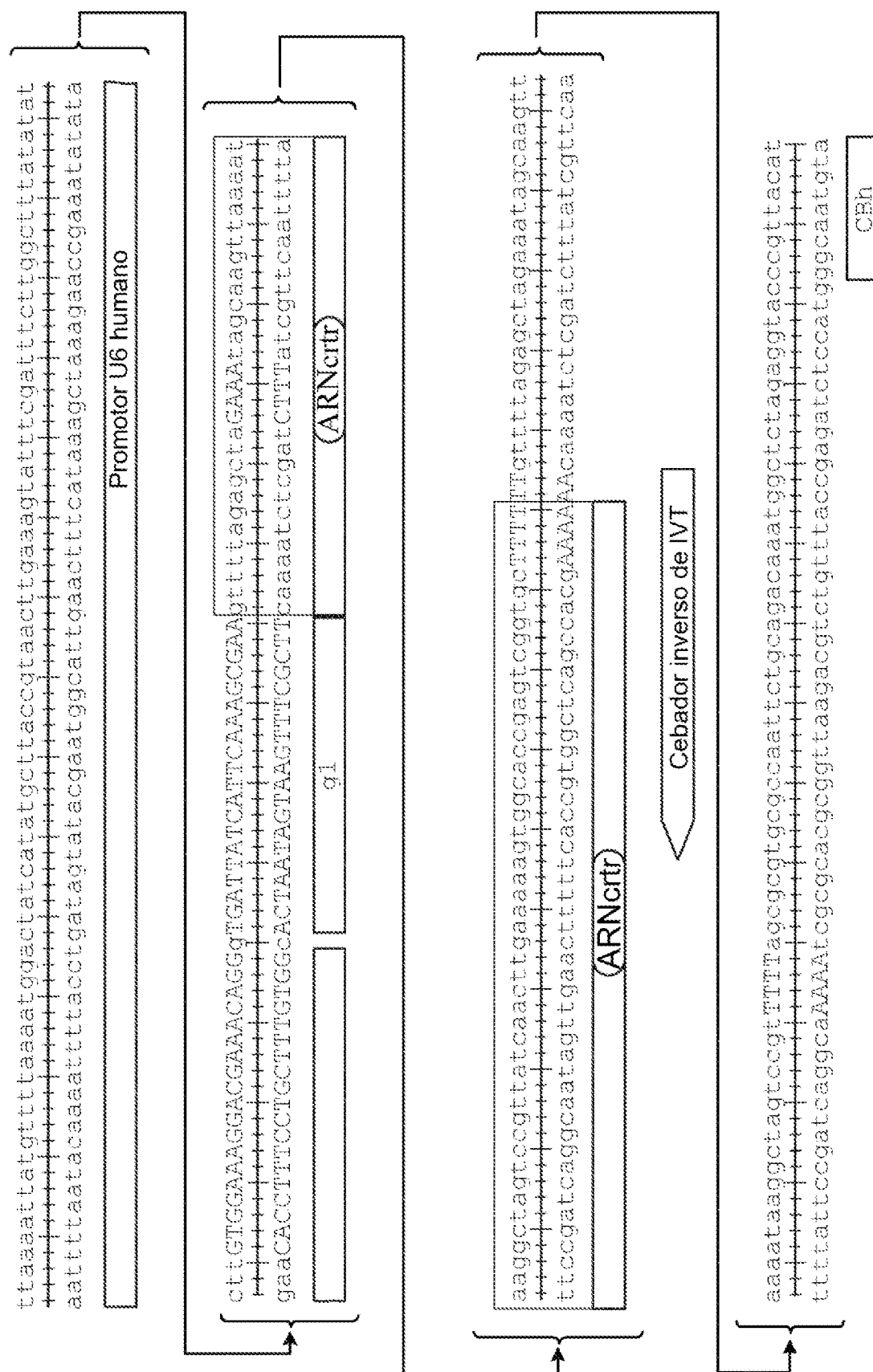


FIG. 17