

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 916 344**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61F 9/008 (2006.01)

A61K 39/395 (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: **16.06.2017 PCT/US2017/038012**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2017 WO17218981**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2017 E 17814228 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2022 EP 3472317**

54 Título: **Composiciones y métodos para reducir la neovascularización ocular**

30 Prioridad:

16.06.2016 US 201662351231 P

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

30.06.2022

73 Titular/es:

**ADVERUM BIOTECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
800 Saginaw Drive
Redwood City, CA 94063, US**

72 Inventor/es:

**BLUMENKRANZ, MARK y
GASMI, MEHDI**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 916 344 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

Composiciones y métodos para reducir la neovascularización ocular

5 Antecedentes de la descripción

10 El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una proteína señal producida por las células que estimula la vasculogénesis y la angiogénesis. VEGF puede ser parte del sistema que restaura el suministro de oxígeno a los tejidos cuando la circulación sanguínea es inadecuada. La función normal de VEGF puede ser crear nuevos vasos sanguíneos durante el desarrollo embrionario, nuevos vasos sanguíneos después de una lesión, músculo después del ejercicio y nuevos vasos para eludir los vasos bloqueados.

15 La sobreexpresión de VEGF puede contribuir a diversos estados de enfermedad y afecciones en los mamíferos. La expresión de VEGF en ciertos tipos de cáncer puede permitir que las células cancerosas crezcan y hagan metástasis. La sobreexpresión de VEGF puede provocar enfermedad vascular en la retina del ojo y otras partes del cuerpo.

20 VEGF y los receptores de VEGF (VEGFR) están implicados en una serie de enfermedades, lo que incluye el desarrollo de neovascularización coroidea (CNV) y la degeneración macular relacionada con la edad. Los ejemplos de enfermedades o afecciones oculares asociadas con la actividad de VEGF y/o VEGFR incluyen degeneración macular relacionada con la edad (AMD) neovascular (húmeda), edema macular después de la oclusión de la vena retiniana (RVO), edema macular diabético (DME), retinopatía diabética (DR) en pacientes con DME, retinopatía isquémica, neovascularización intraocular, AMD seca, neovascularización retiniana, isquemia retiniana diabética, edema retiniano diabético, retinopatía diabética proliferativa, oclusión de la vena retiniana central y oclusión de la vena retiniana ramificada.

30 Wimmer y otros (2015) "Functional Characterization of AAV-Expressed Recombinant Anti-VEGF Single-Chain Variable Fragments In Vitro", JOURNAL OF OCULAR PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS vol. 31, núm. 5, 1, páginas 269-276 informan los resultados de experimentos *in vitro* que se realizaron para determinar si las moléculas anti-VEGF derivadas de ranibizumab pueden producirse en una línea celular de riñón de mamífero después de la transferencia de genes mediada por AAV.

Resumen de la descripción

35 La invención proporciona composiciones farmacéuticas para su uso como se define en las reivindicaciones adjuntas. La descripción que se expone a continuación proporciona información de antecedentes técnicos y no pretende definir la invención como tal, sino más bien facilitar la comprensión y el funcionamiento de la invención al tiempo que la coloca en un contexto técnico.

40 Si bien algunas terapias de inyección basadas en proteínas o anticuerpos están disponibles para el tratamiento de la AMD, por ejemplo, ranibizumab y bevacizumab, un método de terapia génica para suministrar un agente anti-VEGF en un ojo puede proporcionar una opción de tratamiento mejorada para los pacientes porque la terapia génica puede proporcionar una liberación prolongada o sostenida del agente terapéutico *in vivo* sin necesidad de inyecciones repetidas, lo que puede aumentar los riesgos de inflamación, infección y otros efectos adversos en algunos pacientes. Adicionalmente, al no requerir inyecciones repetidas, la terapia génica aborda el desafío de cumplimiento y adherencia del paciente asociado con las terapias que requieren inyecciones repetidas, ya que el incumplimiento puede dar como resultado la pérdida de la visión y el deterioro de la enfermedad o afección ocular. La tasa de incumplimiento y falta de adherencia a los regímenes de tratamiento que requieren viajes repetidos o frecuentes a los consultorios médicos para su administración es mayor entre los pacientes de edad avanzada, que son los más afectados por la AMD. El suministro de un agente terapéutico en el ojo de un paciente mediante terapia génica puede proporcionar por tanto una opción de tratamiento más segura, potencialmente más rentable y más conveniente para los pacientes, y mejorar los resultados de los pacientes al abordar el problema del incumplimiento y la falta de adherencia.

55 La presente descripción se refiere a composiciones farmacéuticas y métodos de prevención o tratamiento de la neovascularización ocular, tales como AMD y CNV, en un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) mediante la administración por vía subretiniana o intravítrea de una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un vector o partículas virales que comprenden un ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF, tal como sFlt-1, ranibizumab o bevacizumab.

60 En algunos aspectos, en la presente descripción se describe un método para tratar una enfermedad o afección ocular, el método comprende administrar una dosis unitaria de una suspensión farmacéutica a un sujeto primate mediante inyección en un ojo, en donde una dosis unitaria de la suspensión farmacéutica comprende: de 1E12 a 1E13 genomas de vector de rAAV que tiene una variante de la proteína de la cápside que comprende una inserción de secuencia de aminoácidos seleccionada de LGETTRP, NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTR, RAGGSVG, AVDTTKF y STGKVPN en una posición que corresponde a los aminoácidos 570-611 de la proteína de

la cápside VP1 en AAV2; y una secuencia heteróloga que codifica un polipéptido anti-factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF). En algunos casos, la dosis unitaria comprende de 2E12 a 6E12 genomas de vector. En algunos casos, el sujeto es un primate no humano. En algunos casos, el sujeto es un ser humano. En algunos casos, la afección o enfermedad ocular es degeneración macular relacionada con la edad (AMD) neovascular (húmeda), edema macular después de la oclusión de la vena retiniana, edema macular diabético (DME), oclusión de la vena retiniana o retinopatía diabética asociada con DME. En algunos casos, la afección o enfermedad ocular es la neovascularización coroidea o AMD. En algunos casos, la administración de la suspensión da como resultado una reducción del porcentaje de lesiones de grado IV en al menos un 5 % en comparación con un control de vehículo, según lo medido mediante fotografía de fondo de ojo en color. En algunos casos, la reducción en porcentaje de lesiones de grado IV es de al menos 10 %. En algunos casos, la dosis unitaria comprende un volumen que no excede los 100 µl. En algunos casos, la dosis unitaria comprende un volumen que no excede los 50 µl. En algunos casos, la inserción es LGETTRP en una posición entre los aminoácidos 587 y 588 en AAV2. En algunos casos, el sujeto responde al menos a uno de ranibizumab, bevacizumab y sVEGFR-1. En algunos casos, el sujeto se ha tratado previamente con ranibizumab o bevacizumab. En algunos casos, la inyección es intravítrea. En algunos casos, la inyección es subretiniana. En algunos casos, la administración por inyección se produce no más de una vez en al menos 2 años. En algunos casos, la administración por inyección se produce no más de una vez en al menos 5 años. En algunos casos, la administración es una administración única. En algunos casos, el método comprende además agitar la suspensión para asegurar una distribución uniforme antes de la etapa de administración. En algunos casos, el método comprende además calentar la suspensión hasta temperatura ambiente antes de la etapa de administración. En algunos casos, la suspensión comprende además un tensioactivo. En algunos casos, el tensioactivo se selecciona de polisorbatos, dodecilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio, óxido de laurildimetilamina, alcoholes polietoxilados, polioxietilensorbitán, octoxinol, Brij, plurónico y aceite de ricino polioxilado. En algunos casos, la suspensión comprende además fenol, manitol, sorbitol o cloruro de sodio. En algunos casos, el método comprende además administrar una solución antibiótica o un ungüento de sulfato de atropina después de la inyección. En algunos casos, la solución antibiótica comprende ciprofloxacino. En algunos casos, el polipéptido anti-VEGF es un anticuerpo monoclonal humanizado. En algunos casos, el polipéptido anti-VEGF es un fragmento de anticuerpo o Fab. En algunos casos, el anticuerpo monoclonal humanizado es ranibizumab o bevacizumab. En algunos casos, el polipéptido anti-VEGF es una forma truncada soluble del receptor 1 de VEGF (sVEGFR-1).

En otros aspectos, también se describe en la presente descripción un método para tratar una afección o enfermedad ocular, el método comprende: agitar una composición en suspensión, que comprende: un rAAV que tiene una variante de la proteína de la cápside que comprende una inserción de secuencia de aminoácidos seleccionada de LGETTRP, NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTTR, RAGGSVG, AVDTTKF y STGKVPN en una posición que corresponde a los aminoácidos 570-611 de la proteína de la cápside VP1 en AAV2; y una secuencia heteróloga que codifica un polipéptido anti-factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF); y administrar la composición en suspensión a un ojo de un sujeto humano mediante inyección. En algunos casos, la inserción es LGETTRP entre los aminoácidos 587 y 588 de AAV2. En algunos casos, el sujeto se caracteriza por haberse tratado previamente con ranibizumab o bevacizumab. En algunos casos, el sujeto responde al menos a uno de ranibizumab y bevacizumab. En algunos casos, el polipéptido anti-VEGF es un anticuerpo monoclonal humanizado. En algunos casos, el polipéptido anti-VEGF es un fragmento de anticuerpo o Fab. En algunos casos, el anticuerpo monoclonal humanizado es ranibizumab o bevacizumab. En algunos casos, el polipéptido anti-VEGF es una forma truncada soluble del receptor 1 de VEGF (sVEGFR-1). En algunos casos, el volumen administrado al sujeto no excede los 50 µl. En algunos casos, el volumen administrado al sujeto no excede los 100 µl. En algunos casos, el volumen comprende una dosis unitaria de 1E12 a 1E13 genomas de vector. En algunos casos, el volumen comprende una dosis unitaria de 2E12 a 6E12 genomas de vector. En algunos casos, la etapa de administración se produce no más de una vez en al menos 2 años. En algunos casos, la etapa de administración es una inyección única. En algunos casos, el método comprende además evaluar la capacidad de respuesta del sujeto a al menos una terapia aprobada antes de administrar la composición. En algunos casos, la terapia aprobada comprende ranibizumab y bevacizumab. En algunos casos, la suspensión comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, el excipiente comprende un tensioactivo o un estabilizador. En algunos casos, el tensioactivo se selecciona de polisorbatos, dodecilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio, óxido de laurildimetilamina, alcoholes polietoxilados, polioxietilensorbitán, octoxinol, Brij, plurónico y aceite de ricino polioxilado. En algunos casos, el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende fenol, manitol, sorbitol o cloruro de sodio. En algunos casos, la afección o enfermedad ocular es degeneración macular relacionada con la edad (AMD) neovascular (húmeda), edema macular después de la oclusión de la vena retiniana, edema macular diabético (DME), oclusión de la vena retiniana o retinopatía diabética asociada con DME. En algunos casos, la afección o enfermedad ocular es la neovascularización coroidea o AMD. En algunos casos, la inyección es intravítrea. En algunos casos, la inyección es subretiniana. En algunos casos, la inserción es LGETTRP en una posición entre los aminoácidos 587 y 588 en AAV2. En algunos casos, el método comprende además calentar la suspensión hasta temperatura ambiente antes de administrarla.

En otros aspectos, también se describe en la presente descripción una composición farmacéutica que comprende una dosis unitaria de una suspensión, que comprende: un rAAV que tiene una variante de la proteína de la cápside que comprende una inserción de secuencia de aminoácidos seleccionada de LGETTRP, NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTTR, RAGGSVG, AVDTTKF y STGKVPN en una posición que corresponde a los aminoácidos

570-611 de la proteína de la cápside VP1 en AAV2; y una secuencia heteróloga que codifica un polipéptido anti-factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF). En algunos casos, la dosis unitaria es de entre 1E12 a 1E13 genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria es de entre 2E12 a 6E12 genomas de vector. En algunos casos, la suspensión se refrigera. En algunos casos, un kit comprende la composición farmacéutica y una solución para diluir la composición farmacéutica. En algunos casos, la solución comprende un tampón, una sal, un alcohol, un tensioactivo o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, el kit comprende además una jeringa. En algunos casos, el polipéptido anti-VEGF es un anticuerpo monoclonal humanizado. En algunos casos, el polipéptido anti-VEGF es un fragmento de anticuerpo o Fab. En algunos casos, el anticuerpo monoclonal humanizado es ranibizumab o bevacizumab. En algunos casos, el polipéptido anti-VEGF es una forma truncada soluble del receptor 1 de VEGF (sVEGFR-1). En algunos casos, la inserción es LGETTRP en una posición entre los aminoácidos 587 y 588 en AAV2.

Breve descripción de los dibujos

Se obtendrá una mejor comprensión de las características y ventajas de la presente invención por referencia a la siguiente descripción detallada, en donde se usan los principios de la invención y sus dibujos adjuntos de los cuales:

La Figura 1 ilustra la neovascularización coroidea (CNV) por láser en un modelo de primate no humano (monos verdes africanos). Se indujeron nueve lesiones mediante una sola aplicación de láser mediante el uso de irradiación láser de 750 mW, 50 μ m, 100 ms para todos los puntos excepto el punto central, que se trató con 400 mW. La fotografía de fondo de ojo en color se realizó inmediatamente después del tratamiento con láser para documentar las lesiones del láser.

La Figura 2 ilustra la secuencia de ácido nucleico de sVEGFR-1.

La Figura 3 ilustra la reducción de la CNV después de la inyección intravítrea de AAV2.7m8-sVEGFR-1. Se administró AAV2.7m8-sVEGFR-1 o un control de vehículo que comprende tampón de formulación a ojos de monos mediante inyección intravítrea a una dosis de $2,1 \times 10^{12}$ vg. Se observó una disminución en el por ciento de lesiones de CNV de grado IV para AAV2.7m8-sVEGFR-1 en comparación con la administración de vehículo solo para la imagen de fondo de ojo recolectada el día 14 (barra gris claro). No se observaron diferencias significativas en el por ciento de lesiones de CNV de grado IV para AAV2.7m8-sVEGFR-1 en comparación con la administración de vehículo solo según lo medido por imágenes de fondo de ojo recolectadas el día 28 (barra gris oscura).

La Figura 4 ilustra que AAV2.7m8-ranibizumab administrado por vía intravítrea previno la aparición de lesiones de CNV de grado IV inducidas por láser. Se administró AAV2.7m8-ranibizumab, ranibizumab solo (control positivo) o control de vehículo que comprende tampón de formulación a ojos de monos mediante inyección intravítrea a una dosis de 2×10^{12} vg. AAV2.7m8-ranibizumab redujo significativamente las lesiones de CNV de grado IV a niveles comparables al ranibizumab solo, según lo medido por imágenes de fondo de ojo recolectadas el día 14 (barra gris claro) y el día 28 (barra gris oscuro).

Descripción detallada de la descripción

Se describen más abajo varios aspectos con referencia a aplicaciones de ejemplo para ilustración. Debe entenderse que se establecen numerosos detalles, relaciones y métodos específicos para proporcionar una comprensión completa de las características descritas en la presente descripción. Sin embargo, un experto en la técnica en cuestión reconocerá fácilmente que las características descritas en la presente descripción pueden ponerse en práctica sin uno o más de los detalles específicos o con otros métodos. Las características descritas en la presente descripción no están limitadas por el orden ilustrado de actos o eventos, ya que algunos actos pueden producirse en diferentes órdenes y/o simultáneamente con otros actos o eventos. Además, no todos los actos o eventos ilustrados son necesarios para implementar una metodología de acuerdo con las características descritas en la presente descripción.

La presente descripción se refiere a composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones oculares que comprenden la administración de una terapia génica, un vector o un constructo mediante inyección intravítrea o subretiniana en el ojo de un primate (por ejemplo, un mono o un ser humano) que comprende una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADNc) que codifica un agente anti-VEGF. Tras la inyección intravítrea o subretiniana de una terapia génica, un vector o un constructo, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente o transgén anti-VEGF, el gen anti-VEGF se expresa in vivo en células o tejidos objetivo, por ejemplo, en células retinianas, para generar proteína o producto génico anti-VEGF para producir un efecto terapéutico.

En algunos casos, una terapia génica, un vector o un constructo que comprende un agente anti-VEGF se usa para tratar o prevenir una o más enfermedades o afecciones oculares, lo que incluye, pero no se limita a, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) neovascular (húmeda), oclusión de la vena retiniana (RVO), edema macular después de RVO, edema macular diabético (DME) y/o retinopatía diabética (DR) en pacientes con DME, o cualquier otra enfermedad o afección ocular relacionada que implique neovascularización (por ejemplo, neovascularización coroidea (CNV)) en un primate o sujeto humano. En algunos casos, los métodos descritos en la presente descripción se usan para tratar una enfermedad o afección ocular que responde a una terapia de estándar de atención o a un

tratamiento existente, por ejemplo, inyección de ranibizumab o bevacizumab. En algunos casos, los métodos descritos en la presente descripción se usan para tratar una enfermedad o afección ocular que responde a al menos un estándar de atención actual, por ejemplo, inyección de ranibizumab o bevacizumab, para AMD, RVO, DME, DR o DR en pacientes con DME.

5 La presente descripción se refiere a composiciones y métodos para la prevención o el tratamiento de la neovascularización ocular en un sujeto (por ejemplo, un primate no humano o un ser humano), mediante la administración por vía subretiniana o intravítrea de una composición farmacéutica adaptada para la terapia génica, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de un vector, por ejemplo, un vector viral tal como un virus adenoasociado (AAV), que comprende un ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF, un transgén terapéutico
10 o una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de homología con sVEGFR-1, ranibizumab, bevacizumab o cualquier otro agente anti-VEGF conocido, o cualquier fragmento funcional, mutante o variante del mismo. Dicha homología puede basarse en la secuencia de ácido
15 nucleico (por ejemplo, ADNc), la secuencia de aminoácidos, la conformación espacial o la estructura de la proteína (por ejemplo, la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria).

En algunos aspectos, un vector descrito en la presente descripción es un virus adenoasociado (AAV) de cualquier serotipo, que comprende una mutación, tal como una inserción de 5 a 11 aminoácidos en un sitio en el bucle GH o el
20 bucle IV expuesto al solvente de una proteína de la cápside. En algunos casos, se inserta una secuencia de aminoácidos de 7 unidades en el bucle GH o en el bucle IV de una proteína de la cápside de AAV. Para el bucle GH/bucle IV de la cápside de AAV, ver, por ejemplo, van Vliet y otros (2006) Mol. Ther. 14:809; Padron y otros (2005) J. Virol. 79:5047; y Shen y otros (2007) Mol. Ther. 15:1955. En algunos casos, una secuencia de aminoácidos que comprende cualquiera de los siguientes: LGETTRP, NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTR, RAGGSVG,
25 AVDTTKF y STGKVPN se inserta en el bucle GH/bucle IV de la proteína de la cápside de AAV (por ejemplo, la proteína de la cápside VP1), lo que crea por tanto variantes de AAV, cada una con una variante de la proteína de la cápside. En algunos casos, la inserción de aminoácidos se produce en las siguientes posiciones de cada serotipo de AAV: entre los aminoácidos 587 y 588 de AAV2, entre los aminoácidos 590 y 591 de AAV1, entre los aminoácidos 575 y 576 de AAV5, entre los aminoácidos 590 y 591 de AAV6, entre los aminoácidos 589 y 590 de AAV7, entre los
30 aminoácidos 590 y 591 de AAV8, entre los aminoácidos 588 y 589 de AAV9 o entre los aminoácidos 589 y 590 de AAV10.

En algunos casos, los aminoácidos pueden insertarse entre dos aminoácidos adyacentes en una posición entre los aminoácidos 570 y 611 de VP1 de AAV2 o la posición correspondiente en la proteína de la cápside de otro serotipo
35 de AAV. En algunos casos, se usa un vector de AAV2 que comprende la inserción de aminoácidos LGETTRP entre los aminoácidos 587 y 588 de VP1 de AAV2 para la terapia génica descrita en la presente descripción. En algunos casos, los métodos de tratamiento descritos en la presente descripción comprenden administrar por vía subretiniana o intravítrea una composición o formulación farmacéutica que comprende un AAV de cualquier serotipo que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF (por ejemplo, sVEGFR-1, ranibizumab o bevacizumab). En algunos aspectos, la inyección subretiniana o intravítrea de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción da como resultado una expresión del agente anti-VEGF en las células objetivo en un ojo de un sujeto, por ejemplo, células retinianas, lo que da como resultado una reducción de la neovascularización o expresión de VEGF y/o inhibición de la expresión o actividad de VEGF in vivo, o alteración de la interacción VEGF-VEGFR in vivo. En algunos casos, la expresión del agente anti-VEGF secuestra el VEGF endógeno in vivo para prevenir la unión o interacción del VEGF con los receptores de VEGF endógenos in vivo.
45

Una ventaja de la terapia génica sobre las inyecciones de proteínas es que la terapia génica proporciona una liberación prolongada o continua de un agente terapéutico (por ejemplo, un agente anti-VEGF) y no requiere inyecciones repetidas. Esta liberación prolongada o sostenida del agente terapéutico es el resultado del suministro de una secuencia de ácido nucleico que codifica el transgén, que se expresa in vivo para proporcionar un efecto terapéutico.
50

En algunos casos, un rAAV puede comprender una variante de la proteína de la cápside que aumenta su infectividad de las células objetivo o tejido en un ojo (por ejemplo, células retinianas), lo que permite un suministro más eficiente de la secuencia de ácido nucleico que codifica un transgén terapéutico en las células o tejido objetivo en el que el transgén terapéutico puede expresarse durante un período de tiempo, por ejemplo, al menos 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 10 o más años. La terapia génica, como se describe en la presente descripción, puede dirigirse a un tejido o tipo de célula específico de interés, por ejemplo, células fotorreceptoras, que pueden ayudar a minimizar los efectos fuera del objetivo o proporcionar un suministro más dirigido del transgén terapéutico in vivo.
60

Con el suministro prolongado o sostenido de un agente anti-VEGF in vivo mediante terapia génica, podría administrarse la composición farmacéutica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el agente anti-VEGF, en una dosis simple o una dosis única. En algunos casos, el número total de dosis de una terapia génica administrada a un sujeto es no más de una vez en al menos 1,5 años, en al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 4 años, al menos 5 años, al menos 6 años, al menos 7 años, al menos 8 años, al menos 9 años o al menos 10 años. En algunos casos, la administración de una terapia génica que comprende una secuencia de ácido nucleico
65

que codifica un agente anti-VEGF es solo una o una vez en la vida de un paciente. En algunos casos, la administración única de una terapia génica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF puede producir un efecto terapéutico en un paciente que dura más de 1 año o más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años. En algunos casos, una terapia génica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF se administra no más de una vez a un paciente en al menos 2 o más, al menos 3 o más, al menos 4 o más, al menos 5 o más, al menos 6 o más, al menos 7 o más, al menos 8 o más, al menos 9 o más, o al menos 10 o más años. En algunos casos, una terapia génica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF se administra a un paciente que responde al menos a un estándar de atención actual o al menos a una terapia existente, por ejemplo, ranibizumab o bevacizumab. En algunos casos, la terapia génica se administra a pacientes que recibieron un tratamiento previo con ranibizumab o bevacizumab antes de recibir la terapia génica.

En algunos casos, la administración única de una terapia génica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF evita la necesidad de que el paciente reciba ranibizumab, bevacizumab o cualquier otra terapia basada en proteínas o tratamientos de estándar de atención para la neovascularización en el ojo durante más de un año, durante más de 1,5 años o durante más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 años. En algunos casos, un paciente que recibe una inyección de una terapia génica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF no necesita inyecciones adicionales de ranibizumab, bevacizumab o cualquier otra terapia basada en proteínas o tratamientos de estándar de atención para la neovascularización en el ojo por el resto de la vida del paciente. En otros casos, un paciente que recibe una inyección única de una terapia génica anti-VEGF puede comenzar la terapia con ranibizumab, bevacizumab y/o cualquier otra terapia aprobada, según sea necesario, después de que hayan transcurrido al menos 1,5, 2, 5, 10 o más años después de recibir la terapia génica.

La terminología de la presente descripción tiene el propósito de describir casos particulares solamente y no pretende ser una limitación de las composiciones, métodos y composiciones de esta descripción.

Las composiciones y métodos de esta descripción como se describen en la presente descripción pueden emplear, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales y descripciones de biología molecular (lo que incluye técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica, inmunquímica y técnicas oftálmicas, que están dentro de la habilidad de aquellos que practican la técnica. Dichas técnicas convencionales incluyen métodos para observar y analizar la retina, o la visión en un sujeto, clonación y propagación de virus recombinantes, formulación de una composición farmacéutica y purificación bioquímica e inmunquímica. Pueden obtenerse ilustraciones específicas de técnicas adecuadas al hacer referencia a los ejemplos de la presente descripción. Sin embargo, también pueden usarse, por supuesto, procedimientos convencionales equivalentes. Dichas técnicas y descripciones convencionales pueden encontrarse en manuales de laboratorio estándar tales como Green, y otros, Eds., *Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV)* (1999); Weiner, y otros, Eds., *Genetic Variation: A Laboratory Manual* (2007); Dieffenbach, Dveksler, Eds., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (2003);; Bowtell y Sambrook, *DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual* (2003); Mount, *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis* (2004); Sambrook y Russell, *Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2006); y Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2002) (todos de Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L., *Biochemistry* (4ta Ed.) W.H. Freeman, N.Y. (1995); Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" IRL Press, Londres (1984); Nelson y Cox, Lehninger, *Principles of Biochemistry*, 3ra Ed., W.H. Freeman Pub., Nueva York (2000); y Berg y otros, *Biochemistry*, 5ta Ed., W.H. Freeman Pub., Nueva York (2002).

En algunos casos, en la presente descripción se describen formulaciones farmacéuticas que comprenden: (a) un virión de virus adenoasociado recombinante (rAAV2) adaptado para terapia génica que comprende: (i) una variante de la proteína de la cápside de AAV2, en donde la variante de la proteína de la cápside de AAV2 comprende la inserción de LGETTRP entre posiciones 587 y 588, y en donde la variante de la proteína de la cápside confiere un aumento en la infectividad de las células retinianas con respecto a un virión de AAV que comprende una proteína de la cápside de AAV2 no variante correspondiente; y (ii) una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un agente anti-VEGF; y (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, el producto génico que se codifica es un polipéptido que tiene al menos 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de homología con ranibizumab, bevacizumab o cualquier otro agente anti-VEGF conocido.

También se describen en la presente descripción métodos para tratar una afección o enfermedad ocular para la cual el producto génico anti-VEGF (por ejemplo, ranibizumab o bevacizumab) está indicado o aprobado para el tratamiento, que comprende administrar una composición farmacéutica adaptada para la terapia génica, es decir, suministrar una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto génico anti-VEGF in vivo, como se describe en la presente descripción, en el ojo de un sujeto mediante inyección subretiniana o intravítrea. En algunos casos, la terapia génica se administra mediante inyección intravítrea. En algunos casos, el agente anti-VEGF es ranibizumab, bevacizumab, sVEGFR-1 o cualquier variante o fragmento funcional de los mismos.

También se describen en la presente descripción composiciones farmacéuticas que comprenden una terapia génica o un vector que codifica una proteína o polipéptido de fusión que tiene al menos 75 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de

homología con una proteína o proteína de fusión anti-VEGF conocida (por ejemplo, ranibizumab o bevacizumab), en donde las composiciones farmacéuticas pueden liofilizarse o suministrarse en forma liofilizada. En algunos casos, se proporciona una forma liofilizada de la composición farmacéutica en un kit con una solución o tampón para reconstituir la composición farmacéutica antes de la administración. En algunos casos, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción se suministran como una solución, una solución homogénea, una suspensión o una suspensión refrigerada.

También se describen en la presente descripción viriones de virus adenoasociado recombinante (rAAV) adaptados para terapia génica para reducir la neovascularización coroidea que comprenden: (a) una variante de la proteína de la cápside de AAV, en donde la variante de la proteína de la cápside confiere un aumento en la infectividad de las células retinianas con respecto a un virión de AAV que comprende una proteína de la cápside de AAV no variante o no modificada correspondiente; (b) una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido o transgén terapéutico con actividad anti-VEGF. En algunos casos, el rAAV usado para la terapia génica es rAAV2.

También se describen en la presente descripción métodos para tratar una afección o enfermedad ocular que comprende administrar un virión de rAAV adaptado para la terapia génica y el suministro in vivo de una secuencia de ácido nucleico para expresar un agente anti-VEGF, o una proteína que tiene una actividad anti-VEGF, como se describe en la presente descripción a un ojo de un sujeto humano; donde el sujeto humano se ha diagnosticado previamente con una afección ocular asociada con neovascularización. En algunos casos, la terapia génica se administra a un paciente que responde al menos a una de las terapias anti-VEGF aprobadas, por ejemplo, ranibizumab o bevacizumab. En algunos casos, la terapia génica se administra a un paciente tratado previamente con al menos una de las terapias aprobadas, por ejemplo, ranibizumab o bevacizumab. En algunos casos, la terapia génica descrita en la presente descripción se administra a un paciente que se trató previamente con al menos una de las terapias aprobadas, por ejemplo, inyecciones de ranibizumab o bevacizumab, y no mostró mejoría. En algunos casos, los pacientes que reciben la terapia génica descrita en la presente descripción tienen uno o más factores de riesgo que desfavorecen el tratamiento del paciente con terapias que requieren múltiples inyecciones repetidas en un ojo, por ejemplo, mayor riesgo de inflamación, infección, presión intraocular elevada y/u otros efectos adversos.

En algunos casos, en la presente descripción se describen métodos y formulaciones farmacéuticas que comprenden: (a) un virión de virus adenoasociado recombinante (rAAV) adaptado para terapia génica que comprende: (i) una variante de la proteína de la cápside de AAV que comprende una inserción de aminoácidos seleccionada de LGETTRP, NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTTR, RAGGSVG, AVDTTKF y STGKVPN en una posición que corresponde a los aminoácidos 570-611 de la proteína de la cápside VP1 en AAV2, y donde la variante de la proteína de la cápside confiere un aumento en la infectividad de una célula retiniana con respecto a un virión de AAV que comprende una proteína de cápside de AAV2 no variante correspondiente; y (ii) una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un agente anti-VEGF; y (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, el producto génico que se codifica es una proteína de fusión, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. En algunos casos, un excipiente farmacéuticamente aceptable comprende un tensioactivo que previene la agregación en la composición farmacéutica descrita en la presente descripción.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica.

La terminología usada en la presente descripción tiene el propósito de describir casos particulares únicamente y no pretende ser limitante. Como se usa en la presente descripción, las formas singulares "un", "una" y "el o la" pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, en la medida en que los términos "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con" o variantes de los mismos se usen en la descripción detallada y/o en las reivindicaciones, se pretende que dichos términos sean inclusive de una manera similar al término "que comprende". El término "que comprende", como se usa en la presente descripción, es sinónimo de "que incluye" o "que contiene", y es inclusivo o abierto.

Cualquier referencia a "o" en la presente descripción pretende abarcar "y/o" a menos que se indique lo contrario. Como se usa en la presente descripción, el término "aproximadamente" un número se refiere a ese número más o menos el 10 % de ese número. El término "aproximadamente" un intervalo se refiere a ese intervalo menos el 10 % de su valor más bajo y más el 10 % de su valor más alto.

El término "sujeto", "paciente" o "individuo" se refiere a primates, lo que incluye primates no humanos, por ejemplo, monos verdes africanos y monos rhesus, y seres humanos. En casos preferidos, el sujeto es un ser humano o un paciente humano.

Los términos "trata", "tratar", "tratamiento", "mejora" o "mejorar" y otros equivalentes gramaticales como se usan en la presente descripción, incluyen aliviar, disminuir o mejorar los síntomas de una enfermedad o afección, prevenir síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas metabólicas subyacentes de los síntomas, inhibir la enfermedad o afección, por ejemplo, detener el desarrollo de la enfermedad o afección, aliviar la enfermedad o afección, provocar la regresión de la enfermedad o afección, mitigar una afección provocada por la enfermedad o afección, o

- detener los síntomas de la enfermedad o condición, y están destinados a incluir la profilaxis. Los términos incluyen además lograr un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o mejoría de la enfermedad subyacente a tratar. Además, se logra un beneficio terapéutico con la erradicación o mejoría de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con la enfermedad subyacente de manera que se observa una mejoría en el paciente, a pesar de que, en algunos casos, el paciente todavía está afectado por la enfermedad subyacente. Para beneficio profiláctico, las composiciones farmacéuticas se administran a un paciente con riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un paciente que informa uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, incluso si no se ha realizado un diagnóstico de la enfermedad.
- Los términos "administra", "administrar", "administración" y similares, como se usan en la presente descripción, pueden referirse a los métodos que se usan para permitir el suministro de composiciones terapéuticas o farmacéuticas al sitio deseado de acción biológica. Estos métodos incluyen inyección intravítrea o subretiniana en un ojo.
- Los términos "cantidad eficaz", "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad farmacéuticamente eficaz", como se usan en la presente descripción, pueden referirse a una cantidad suficiente de al menos una composición o compuesto farmacéutico administrado que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o afección a tratar.
- El término "farmacéuticamente aceptable", como se usa en la presente descripción, puede referirse a un material, tal como un portador o diluyente, que no anula la actividad biológica o las propiedades de un compuesto descrito en la presente descripción, y es relativamente no tóxico (es decir, cuando el material se administra a un individuo no provoca efectos biológicos indeseables ni interactúa de forma perjudicial con ninguno de los componentes de la composición en la que está contenido).
- El término "composición farmacéutica", o simplemente "composición", como se usa en la presente descripción, puede referirse a un compuesto biológicamente activo, opcionalmente mezclado con al menos un componente químico farmacéuticamente aceptable, tal como, aunque no limitado a, portadores, estabilizadores, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, excipientes y similares.
- Un "vector de AAV" o "vector de rAAV", como se usa en la presente descripción, se refiere a un vector de virus adenoasociado (AAV) o un vector de AAV recombinante (rAAV) que comprende una secuencia de polinucleótidos que no es de origen AAV (es decir, un polinucleótido heterólogo a AAV tal como una secuencia de ácido nucleico que codifica un transgén terapéutico, por ejemplo, ranibizumab), típicamente una secuencia de interés para la transformación genética de una célula. En general, el polinucleótido heterólogo está flanqueado por al menos una, y generalmente por dos, secuencias repetidas terminales invertidas (ITR) de AAV. El término vector de rAAV abarca tanto partículas de vector de rAAV como plásmidos de vector de rAAV. Un vector de rAAV puede ser monocatenario (ssAAV) o autocomplementario (scAAV).
- Un "virus AAV" o "partícula viral AAV" o "partícula de vector de rAAV" se refiere a una partícula viral compuesta de al menos una proteína de la cápside de AAV (típicamente por todas las proteínas de la cápside de un AAV de tipo silvestre) y un polinucleótido de vector de rAAV. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido que no sea un genoma de AAV de tipo silvestre, tal como un transgén que se suministrará a una célula de mamífero), se denomina típicamente "partícula de vector de rAAV" o simplemente "vector de rAAV". Por tanto, la producción de partículas de rAAV incluye necesariamente la producción de vector de rAAV, ya que dicho vector está contenido dentro de una partícula de rAAV.
- El término "empaquetamiento", como se usa en la presente descripción, puede referirse a una serie de eventos intracelulares que pueden dar como resultado el ensamblaje y la encapsidación de una partícula de rAAV.
- Los genes "rep" y "cap" de AAV se refieren a secuencias de polinucleótidos que codifican proteínas de replicación y encapsidación de virus adenoasociado. Rep y cap de AAV se denominan en la presente descripción "genes de empaquetamiento" de AAV.
- El término "polipéptido" puede abarcar proteínas tanto de origen natural como no natural (por ejemplo, una proteína de fusión), péptidos, fragmentos, mutantes, derivados y análogos de los mismos. Un polipéptido puede ser monomérico, dimérico, trimérico o polimérico. Además, un polipéptido puede comprender varios dominios diferentes, cada uno de los cuales tiene una o más actividades distintas. Para evitar dudas, un "polipéptido" puede ser cualquier longitud superior a dos aminoácidos.
- Como se usa en la presente descripción, "variante de polipéptido" o simplemente "variante" se refiere a un polipéptido cuya secuencia contiene una modificación de aminoácidos. En algunos casos, la modificación puede ser una inserción, duplicación, eliminación, reordenamiento o sustitución de uno o más aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de una proteína o polipéptido de referencia, tal como una proteína nativa o de tipo silvestre. Una variante puede tener una o más sustituciones puntuales de aminoácidos, en las que un solo aminoácido en una posición se ha cambiado a otro aminoácido, una o más inserciones y/o eliminaciones, en las que

se insertan o eliminan uno o más aminoácidos, respectivamente, en la secuencia de la proteína de referencia, y/o truncamientos de la secuencia de aminoácidos en uno o ambos extremos amino o carboxi. Una variante puede tener la misma actividad biológica o una diferente en comparación con la proteína de referencia o la proteína no modificada.

5 En algunos casos, una variante puede tener, por ejemplo, al menos 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de homología de secuencia global con su proteína de referencia homóloga, en donde la proteína de referencia puede ser de origen natural o no natural, o un derivado o variante de una proteína de origen natural. En algunos casos, una variante puede tener al
10 menos aproximadamente 90 % de homología de secuencia global con la proteína de tipo silvestre. En algunos casos, una variante exhibe al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, al menos aproximadamente 99,5 % o al menos aproximadamente 99,9 % de identidad de secuencia global.

15 Como se usa en la presente descripción, "recombinante" puede referirse a una biomolécula, por ejemplo, un gen o una proteína, que (1) se ha eliminado de su entorno natural, (2) no está asociado con la totalidad o una parte de un polinucleótido en el que el gen se encuentra en la naturaleza, (3) está unido operativamente a un polinucleótido al que no está unido en la naturaleza, o (4) no se encuentra en la naturaleza. El término "recombinante" puede usarse en referencia a aislados de ADN clonados, análogos de polinucleótidos sintetizados químicamente o análogos de
20 polinucleótidos que se sintetizan biológicamente mediante sistemas heterólogos, así como también proteínas y/o ARNm codificados por dichos ácidos nucleicos. De esta forma, por ejemplo, una proteína sintetizada por un microorganismo es recombinante, por ejemplo, si se sintetiza a partir de un ARNm sintetizado a partir de un gen recombinante presente en la célula.

25 "Unido operativamente" o "acoplado" puede referirse a una yuxtaposición de elementos genéticos, en donde los elementos están en una relación que les permite operar de una manera esperada. Por ejemplo, un promotor puede estar unido operativamente a una región codificante si el promotor ayuda a iniciar la transcripción de la secuencia codificante. Puede haber residuos intermedios entre el promotor y la región codificante siempre que se mantenga esta relación funcional.

30 El término "vector de expresión" o "constructo de expresión" o "casete" o "plásmido" o simplemente "vector" puede incluir cualquier tipo de constructo genético, lo que incluye los vectores de AAV o rAAV, que contienen un ácido nucleico o polinucleótido que codifica un producto génico en el que una parte o la totalidad de la secuencia codificante de ácido nucleico es capaz de transcribirse y está adaptada para la terapia génica. El transcrito puede
35 traducirse en una proteína. En algunos casos, puede estar parcialmente traducido o no traducido. En ciertos aspectos, la expresión incluye tanto la transcripción de un gen como la traducción del ARNm en un producto génico. En otros aspectos, la expresión solo incluye la transcripción de los genes que codifican el ácido nucleico de interés. Un vector de expresión también puede comprender elementos de control unidos operativamente a la región codificante para facilitar la expresión de la proteína en las células objetivo. La combinación de elementos de control y
40 un gen o genes a los que están unidos operativamente para la expresión a veces puede denominarse "casete de expresión", un gran número de los cuales son conocidos y están disponibles en la técnica o pueden construirse fácilmente a partir de componentes que están disponibles en la técnica.

45 El término "heterólogo" puede referirse a una entidad que es genotípicamente distinta del resto de la entidad con la que se compara. Por ejemplo, un polinucleótido introducido mediante técnicas de ingeniería genética en un plásmido o vector derivado de una especie diferente puede ser un polinucleótido heterólogo. Un promotor extraído de su secuencia codificante nativa y unido operativamente a una secuencia codificante con la que no se encuentra unido de forma natural puede ser un promotor heterólogo.

50 Como se usa en la presente descripción, "7m8" se refiere a la secuencia de aminoácidos de 7 unidades LGETTRP.

"Variante 7m8" se refiere a un rAAV, que puede ser de cualquier serotipo, con la secuencia de aminoácidos LGETTRP insertada en el bucle GH expuesto al solvente de la proteína de la cápside.

55 Cuando se inserta 7m8 en un rAAV2 (también denominado AAV2.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7 unidades LGETTRP se inserta en el bucle GH de la proteína de la cápside de AAV2, por ejemplo, entre las posiciones 587 y 588 de la proteína de la cápside de AAV2. Cuando se inserta 7m8 en un rAAV1 (también denominado AAV1.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7 unidades LGETTRP se inserta en el bucle GH de la proteína de la cápside de AAV1, por ejemplo, entre los aminoácidos 590 y 591 de la proteína de la cápside de AAV1. Cuando se inserta 7m8
60 en un rAAV5 (también denominado AAV5.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7 unidades LGETTRP se inserta en el bucle GH de la proteína de la cápside de AAV5, por ejemplo, entre los aminoácidos 575 y 576 de la proteína de la cápside de AAV5. Cuando se inserta 7m8 en un rAAV6 (también denominado AAV6.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7 unidades LGETTRP se inserta en el bucle GH de la proteína de la cápside de AAV6, por ejemplo, entre los aminoácidos 590 y 591 de la proteína de la cápside de AAV6. Cuando se inserta 7m8 en un rAAV7 (también denominado AAV7.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7 unidades LGETTRP se inserta en el bucle GH
65 de la proteína de la cápside de AAV7, por ejemplo, entre los aminoácidos 589 y 590 de la proteína de la cápside de

AAV7. Cuando se inserta 7m8 en un rAAV8 (también denominado AAV8.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7 unidades LGETTRP se inserta en el bucle GH de la proteína de la cápside de AAV8, por ejemplo, entre los aminoácidos 590 y 591 de la proteína de la cápside de AAV8. Cuando se inserta 7m8 en un rAAV9 (también denominado AAV9.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7 unidades LGETTRP se inserta en el bucle GH de la proteína de la cápside de AAV9, por ejemplo, entre los aminoácidos 588 y 589 de la proteína de la cápside de AAV9. Cuando se inserta 7m8 en un rAAV10 (también denominado AAV10.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7 unidades LGETTRP se inserta en el bucle GH de la proteína de la cápside de AAV10, por ejemplo, entre los aminoácidos 589 y 590 de la proteína de la cápside de AAV10.

En algunos casos, en la presente descripción se describen viriones de virus adenoasociado recombinante (rAAV) para reducir la neovascularización que comprenden: (a) una variante de la proteína de la cápside de AAV, donde la variante de la proteína de la cápside de AAV comprende una modificación de aminoácidos en una región expuesta al solvente de la proteína de la cápside y muestra una infectividad aumentada de las células retinianas con respecto a una proteína de la cápside de AAV no variante correspondiente; y (b) un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico o un transgén terapéutico, y donde la administración de una cantidad eficaz de rAAV mediante inyección intravítrea o subretiniana en un ojo de un primate o sujeto humano da como resultado una reducción en la neovascularización en el ojo.

También se describen en la presente descripción viriones de virus adenoasociado recombinante (rAAV) para reducir la neovascularización que comprenden: (a) una variante de la proteína de la cápside de AAV, donde la variante de la proteína de la cápside de AAV comprende una modificación de aminoácidos en una región expuesta al solvente de la proteína de la cápside de AAV, y en donde la variante de la proteína de la cápside confiere una mayor capacidad para cruzar una membrana limitante interna (ILM) en un ojo; y (b) un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico, y donde la administración de una cantidad eficaz de rAAV mediante inyección intravítrea o subretiniana en un ojo de un primate o sujeto humano da como resultado una reducción de la neovascularización en el ojo.

También se describen en la presente descripción viriones de virus adenoasociado recombinante (rAAV), que comprenden: (a) una variante de la proteína de la cápside de AAV, en donde la variante de la proteína de la cápside de AAV comprende una inserción peptídica de LGETTRP después de una posición de aminoácido correspondiente a 587 en AAV2, y en donde la variante de la proteína de la cápside confiere una mayor capacidad para administrar un producto génico a través de una membrana limitante interna (ILM) de un ojo en primates; y (b) un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el producto génico.

También se describen en la presente descripción composiciones de terapia génica en forma de dosis unitaria para tratar una afección o enfermedad ocular, que comprenden: (a) un virión de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende: (i) una variante de la proteína de la cápside de AAV, en donde la variante de la proteína de la cápside de AAV comprende una modificación de aminoácidos en una región expuesta al solvente de la proteína de la cápside y muestra una mayor infectividad de las células retinianas con respecto a una proteína de la cápside de AAV no variante correspondiente; y (ii) un ácido nucleico heterólogo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un producto génico, en donde el producto génico, cuando se transduce, reduce la neovascularización en un ojo de un primate o un sujeto humano; y (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable; donde el virión de rAAV está en una cantidad suficiente para reducir al menos parcialmente la neovascularización cuando se administra mediante inyección intravítrea o subretiniana en el ojo del primate como dosis unitaria.

También se describen en la presente descripción métodos para tratar una afección o enfermedad ocular, que comprenden administrar una dosis unitaria de una terapia génica de rAAV descrita en la presente descripción a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano.

El término "agente anti-VEGF" incluye cualquier agente terapéutico, lo que incluye proteínas, polipéptidos, péptidos, proteínas de fusión, proteínas multiméricas, productos génicos, anticuerpos, anticuerpos monoclonales humanos, fragmentos de anticuerpos, aptámeros, moléculas pequeñas, inhibidores de quinasas, receptores o fragmentos de receptores, o moléculas de ácido nucleico, que puede reducir, interferir, alterar, bloquear y/o inhibir la actividad o función de un VEGF endógeno y/o un receptor de VEGF endógeno (VEGFR), o la vía o interacción VEGF-VEGFR in vivo. Un agente anti-VEGF puede ser cualquiera de los agentes terapéuticos conocidos que pueden reducir el crecimiento o la formación de nuevos vasos sanguíneos y/o el edema o la hinchazón, cuando se suministran en una célula, tejido o sujeto in vivo, por ejemplo, ranibizumab o bevacizumab. En algunos casos, un agente anti-VEGF puede ser de origen natural, no natural o sintético. En algunos casos, un agente anti-VEGF puede derivarse de una molécula de origen natural que posteriormente se modificó o mutó para conferir una actividad anti-VEGF. En algunos casos, un agente anti-VEGF es una proteína de fusión o quimérica. En dichas proteínas, los dominios funcionales o los polipéptidos se fusionan artificialmente con un resto o un polipéptido para crear una proteína de fusión o quimérica que puede secuestrar VEGF in vivo o funcionar como un señuelo de VEGFR. En algunos casos, un agente anti-VEGF es una proteína de fusión o quimérica que bloquea la interacción del VEGFR endógeno con sus ligandos.

65

Como se usa en la presente descripción, "VEGF" puede referirse a cualquier isoforma de VEGF, a menos que se indique lo contrario, lo que incluye, pero no se limita a, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, o cualquier combinación, o cualquier fragmento funcional o variante de los mismos. A menos que se indique lo contrario, "VEGF" puede referirse a cualquier miembro de la familia VEGF, lo que incluye los miembros: VEGF-A, factor de crecimiento placentario (PGF), VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D, o cualquier combinación, fragmento funcional o variante de los mismos.

Como se usa en la presente descripción, "receptor de VEGF" o "VEGFR" o "VEGF-R" puede usarse para referirse a cualquiera de los receptores de VEGF, lo que incluye, pero no se limita a, VEGFR-1 (o Flt-1), VEGFR-2 (o Flk-1/KDR) y VEGFR-3 (o Flt-4). VEGFR puede ser una forma unida a la membrana o soluble, o un fragmento funcional o truncamiento de un receptor.

Los ejemplos de agentes anti-VEGF incluyen, pero no se limitan a, ranibizumab, bevacizumab o cualquier combinación, variante o fragmento funcional de los mismos.

Los encabezados de las secciones que se usan en la presente descripción tienen únicamente propósitos organizativos y no deben interpretarse como una limitación de la materia objeto descrita.

Vectores

Pueden usarse diversos vectores virales en la terapia génica, lo que incluye adenovirus, virus adenoasociados, retrovirus y lentivirus.

En algunos casos, las composiciones farmacéuticas y los métodos de la descripción proporcionan el suministro de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, una secuencia de ADNc) que codifica un agente anti-VEGF, un fragmento funcional o una variante del mismo, a las células retinianas en un sujeto humano o en un paciente que lo necesita (por ejemplo, un paciente diagnosticado con AMD, RVO, DME). El suministro del ácido nucleico de un transgén terapéutico a un paciente mediante el uso de un sistema de suministro, tal como rAAV o un vector viral, también se denomina terapia génica.

En algunos casos, el suministro de la secuencia de ácido nucleico agente anti-VEGF puede realizarse mediante el uso de cualquier "vector" adecuado (a veces también denominado como "suministro de genes" o "vehículo de transferencia de genes"). El vector (por ejemplo, rAAV), el vehículo de suministro, el vehículo de suministro de genes o el vehículo de transferencia de genes, pueden abarcar cualquier macromolécula adecuada o complejo de moléculas que comprenda un polinucleótido a suministrarse a una célula objetivo, por ejemplo, células retinianas, lo que incluye fotorreceptores, una célula ganglionar retiniana, una célula de Müller, una célula bipolar, una célula amacrina, una célula horizontal o una célula del epitelio pigmentado retiniano. En algunos casos, una célula objetivo puede ser cualquier célula a la que se suministra la molécula de ácido nucleico o el gen. El polinucleótido a suministrar puede comprender una secuencia codificante de un transgén terapéutico, tal como una secuencia que codifica ranibizumab.

La composición y los métodos de la descripción proporcionan cualquier método adecuado para el suministro de una secuencia de ácido nucleico anti-VEGF (por ejemplo, ranibizumab) en un ojo o células retinianas de un primate no humano o un sujeto humano. En algunos casos, el suministro de la molécula de ácido nucleico, el polinucleótido o la terapia génica se formula o adapta para inyección intravítrea en el ojo de un primate no humano o de un sujeto humano.

En algunos casos, los vectores adecuados incluyen, pero no se limitan a, vectores virales tales como adenovirus, virus adenoasociados (AAV) y retrovirus, lentivirus, liposomas, complejos que contienen lípidos, nanopartículas y otros complejos macromoleculares capaces del suministro de un polinucleótido a las células retinianas. En algunos casos, el vector viral comprende un promotor eucariota fuerte unido operativamente al polinucleótido, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV) o un promotor constitutivo.

En algunos casos, un vector puede comprender un vector viral recombinante que incorpora una o más moléculas de ácido nucleico. Como se describe en la presente descripción, los ácidos nucleicos se refieren a polinucleótidos. Ácido nucleico y polinucleótido pueden usarse indistintamente. En algunos casos, los ácidos nucleicos comprenden ADN o ARN. En algunos casos, los ácidos nucleicos incluyen ADN (por ejemplo, ADNc) o ARN para la expresión de un agente anti-VEGF o transgén terapéutico. En algunos casos, el ARN puede incluir un transcrito de un gen de interés (por ejemplo, ranibizumab), intrones, regiones no traducidas (UTR), secuencias de terminación y similares. En otros casos, el ADN puede incluir, pero no se limita a, secuencias tales como secuencias promotoras, un gen de interés (por ejemplo, ranibizumab), UTR, secuencias de terminación y similares. En algunos casos, puede usarse una combinación de ADN y ARN.

En algunos casos, la presente descripción proporciona un virus recombinante, tal como un virus adenoasociado recombinante (rAAV) como vector para el suministro y expresión de ranibizumab, bevacizumab, sFLT-1, o cualquier fragmento funcional o variante de los mismos, en un sujeto.

En algunos casos, cualquier vector viral adecuado puede manipularse por ingeniería genética u optimizarse para su uso con las composiciones y métodos de la descripción. Por ejemplo, los vectores virales recombinantes derivados de adenovirus (Ad) o virus adenoasociados (AAV) pueden alterarse de manera que son defectuosos para la replicación en sujetos humanos o primates. En algunos casos, los sistemas de vectores virales híbridos pueden obtenerse mediante el uso de métodos conocidos por los expertos en la técnica y usarse para suministrar un ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF a las células retinianas. En algunos casos, un sistema de suministro viral o terapia génica pueden integrar una secuencia de ácido nucleico que comprende un gen anti-VEGF en el genoma de la célula objetivo (por ejemplo, el genoma de las células retinianas) y dar como resultado una expresión génica estable del gen a lo largo del tiempo. En algunos casos, el gen anti-VEGF no está integrado en el genoma de la célula objetivo y se expresa a partir de un plásmido o vector introducido en las células objetivo.

En algunos casos, un vector viral adecuado para suministrar una secuencia de ácido nucleico de un anti-VEGF a las células retinianas es AAV o rAAV, que son pequeños virus de ADN monocatenario sin envoltura. Los rAAV son parvovirus humanos no patógenos y pueden hacerse dependientes de virus auxiliares, lo que incluye adenovirus, virus del herpes simple, virus vaccinia y CMV, para la replicación. La exposición a AAV de tipo silvestre (wt) no está asociada ni se conoce que provoque ninguna patología humana y es común en la población general, lo que hace que AAV o rAAV sean un sistema de suministro adecuado para la terapia génica. El AAV y el rAAV usados para la terapia génica para suministrar un transgén terapéutico, por ejemplo, ranibizumab, pueden ser de cualquier serotipo. En algunos casos, las composiciones farmacéuticas y los métodos de la descripción proporcionan el uso de cualquier serotipo de AAV adecuado, lo que incluye AAV1, AAV2, AAV2.5, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, rh10, AAV-DJ, y cualquier AAV híbrido o quimérico de los mismos. En algunos casos, el serotipo usado se basa en el tropismo del virus o la infectividad de una célula objetivo de interés. En algunos casos, se usa AAV2 o rAAV2 para suministrar una secuencia de ácido nucleico que codifica ranibizumab en un ojo o en las células retinianas de un sujeto mediante una inyección intravítrea o subretiniana. En algunos casos, se usa rAAV2.7m8 para suministrar la secuencia de ácido nucleico de ranibizumab en las células retinianas de un sujeto.

En algunos casos, los virus, partículas o viriones de AAV o rAAV que comprenden una variante de la proteína de la cápside que tiene una mayor infectividad de las células objetivo, por ejemplo, las células retinianas, se usan para aumentar la transducción de las células retinianas o para aumentar el direccionamiento del suministro de genes a las células retinianas en un sujeto. En algunos casos, el virión de rAAV comprende una modificación de aminoácidos en un bucle GH/bucle IV de la proteína de la cápside de la proteína de la cápside de AAV. En algunos casos, el sitio de modificación es una parte accesible al solvente del bucle GH/bucle IV de la proteína de la cápside de AAV. Se conocen varias variantes de cápside de AAV, lo que incluye la variante 7m8. En algunos casos, un virión de rAAV comprende una variante de la proteína de la cápside de AAV que comprende una inserción de 5 a 11 aminoácidos, por ejemplo, una secuencia de 7 aminoácidos, en el bucle GH de una proteína de la cápside con respecto a una proteína de la cápside de AAV original correspondiente, y en donde la variante de la proteína de la cápside confiere una mayor infectividad de una célula retiniana en comparación con la infectividad de la célula retiniana mediante un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original o no modificada correspondiente. En algunos casos, puede insertarse una inserción de cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos en el bucle GH de una proteína de la cápside: LGETTRP (7m8), NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTTR, RAGGSVG, AVDTTKF y STGKVPN. En algunos casos, se usa para la terapia génica rAAV.7m8 que comprende ranibizumab.

En algunos casos, cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTTR, RAGGSVG, AVDTTKF y STGKVPN pueden insertarse en las siguientes posiciones para generar una variante de rAAV para su uso en terapia génica: entre las posiciones 587 y 588 de la proteína de la cápside de AAV2; entre los aminoácidos 590 y 591 de la proteína de la cápside de AAV1; entre los aminoácidos 575 y 576 de la proteína de la cápside de AAV5; entre los aminoácidos 590 y 591 de la proteína de la cápside de AAV6; entre los aminoácidos 589 y 590 de la proteína de la cápside de AAV7; entre los aminoácidos 590 y 591 de la proteína de la cápside de AAV8; entre los aminoácidos 588 y 589 de la proteína de la cápside de AAV9; o entre los aminoácidos 589 y 590 de la proteína de la cápside de AAV10.

En algunos casos, el ácido nucleico que codifica un producto génico tal como el ranibizumab puede estar bajo el control transcripcional de un promotor que inicia la transcripción del gen. En algunos casos, el promotor es un promotor "fuerte" o constitutivamente activo, por ejemplo, el promotor CMV. En algunos casos, el promotor de la conexina 36 se usa para impulsar la expresión de un transgén terapéutico, por ejemplo, ranibizumab. En algunos casos, los promotores específicos de tejido pueden usarse para efectuar la transcripción en tejidos o células específicos, tales como células retinianas, para reducir la toxicidad potencial o los efectos indeseables en células no objetivo. En algunos casos, un virus y/o plásmido recombinante usado para generar un virus de rAAV puede comprender otros elementos transcripcionales o reguladores, tales como secuencia poli A (poliadenilación), regiones no traducidas (UTR), UTR 3' o secuencias de terminación. En algunos casos, puede expresarse más de un gen a partir del vector o plásmido mediante el uso del sitio de entrada interno del ribosoma (IRES) o elementos similares que permiten la coexpresión de dos o más proteínas o crean ARNm multigénico o policistónico.

En algunos casos, el rAAV y/o el plásmido usado para generar virus de rAAV comprende los siguientes elementos de ácido nucleico: una primera secuencia ITR; una secuencia promotora; una secuencia de intrones; una primera secuencia UTR; una secuencia que codifica un transgén anti-VEGF; una segunda secuencia UTR; una secuencia poliA; y una segunda secuencia ITR. En algunos casos, se usa una secuencia enlazadora entre cada uno de estos elementos de ácido nucleico. En algunos casos, la secuencia que codifica un transgén anti-VEGF comprende una secuencia que codifica la proteína de fusión del transgén anti-VEGF o un fragmento funcional de la misma.

En algunos casos, el vector viral de la descripción se mide como genomas de vector. En algunos casos, una dosis unitaria de virus recombinantes de esta descripción comprende de 1×10^{10} a 2×10^{10} , de 2×10^{10} a 3×10^{10} , de 3×10^{10} a 4×10^{10} , de 4×10^{10} a 5×10^{10} , de 5×10^{10} a 6×10^{10} , de 6×10^{10} a 7×10^{10} , de 7×10^{10} a 8×10^{10} , de 8×10^{10} a 9×10^{10} , de 9×10^{10} a 10×10^{10} , de 1×10^{11} a 2×10^{11} , de 2×10^{11} a 3×10^{11} , de 3×10^{11} a 4×10^{11} , de 4×10^{11} a 5×10^{11} , de 5×10^{11} a 6×10^{11} , de 6×10^{11} a 7×10^{11} , de 7×10^{11} a 8×10^{11} , de 8×10^{11} a 9×10^{11} , de 9×10^{11} a 10×10^{11} , de 1×10^{12} a 2×10^{12} , de 2×10^{12} a 3×10^{12} , de 3×10^{12} a 4×10^{12} , de 4×10^{12} a 5×10^{12} , de 5×10^{12} a 6×10^{12} , de 6×10^{12} a 7×10^{12} , de 7×10^{12} a 8×10^{12} , de 8×10^{12} a 9×10^{12} , de 9×10^{12} a 10×10^{12} , de 1×10^{13} a 2×10^{13} , de 2×10^{13} a 3×10^{13} , de 3×10^{13} a 4×10^{13} , de 4×10^{13} a 5×10^{13} , de 5×10^{13} a 6×10^{13} , de 6×10^{13} a 7×10^{13} , de 7×10^{13} a 8×10^{13} , de 8×10^{13} a 9×10^{13} o de 9×10^{13} a 10×10^{13} genomas de vector. En algunos casos, el rAAV de esta descripción es de aproximadamente $2,1 \times 10^{12}$ genomas de vector. En algunos casos, el rAAV de esta descripción es de entre 10^{10} a 10^{13} , entre 10^{10} a 10^{11} , entre 10^{11} a 10^{12} , entre 10^{12} a 10^{13} , entre 10^{13} a 10^{14} , entre 2×10^{11} a 4×10^{11} , entre 3×10^{11} a 5×10^{11} , entre 4×10^{11} a 6×10^{11} , entre 5×10^{11} a 7×10^{11} , entre 6×10^{11} a 8×10^{11} , entre 7×10^{11} a 9×10^{11} , entre 8×10^{11} a 10×10^{11} , entre 1×10^{12} a 3×10^{12} , entre 2×10^{12} a 4×10^{12} , entre 3×10^{12} a 5×10^{12} , entre 4×10^{12} a 6×10^{12} , entre 5×10^{12} a 7×10^{12} , entre 6×10^{12} a 8×10^{12} , entre 7×10^{12} a 9×10^{12} , entre 8×10^{12} a 10×10^{12} , entre 1×10^{13} a 5×10^{13} , entre 5×10^{13} a 10×10^{13} , entre 10^{12} a 5×10^{12} o entre 5×10^{12} a 1×10^{13} genomas de vector.

En algunos casos, los virus recombinantes de esta descripción tienen aproximadamente $1E10$, aproximadamente $1,5E10$, aproximadamente $2E10$, aproximadamente $2,5E10$, aproximadamente $3E10$, aproximadamente $3,5E10$, aproximadamente $4E10$, aproximadamente $4,5E10$, aproximadamente $5E10$, aproximadamente $5,5E10$, aproximadamente $6E10$, aproximadamente $6,5E10$, aproximadamente $7E10$, aproximadamente $7,5E10$, aproximadamente $8E10$, aproximadamente $8,5E10$, aproximadamente $9E10$, aproximadamente $9,5E10$, aproximadamente $10E10$, aproximadamente $1E11$, aproximadamente $1,5E11$, aproximadamente $2E11$, aproximadamente $2,5E11$, aproximadamente $3E11$, aproximadamente $3,5E11$, aproximadamente $4E11$, aproximadamente $4,5E11$, aproximadamente $5E11$, aproximadamente $5,5E11$, aproximadamente $6E11$, aproximadamente $6,5E11$, aproximadamente $7E11$, aproximadamente $7,5E11$, aproximadamente $8E11$, aproximadamente $8,5E11$, aproximadamente $9E11$, aproximadamente $9,5E11$, aproximadamente $10E11$, aproximadamente $1E12$, aproximadamente $1,3E12$, aproximadamente $1,5E12$, aproximadamente $2E12$, aproximadamente $2,1E12$, aproximadamente $2,3E12$, aproximadamente $2,5E12$, aproximadamente $2,7E12$, aproximadamente $2,9E12$, aproximadamente $3E12$, aproximadamente $3,1E12$, aproximadamente $3,3E12$, aproximadamente $3,5E12$, aproximadamente $3,7E12$, aproximadamente $3,9E12$, aproximadamente $4E12$, aproximadamente $4,1E12$, aproximadamente $4,3E12$, aproximadamente $4,5E12$, aproximadamente $4,7E12$, aproximadamente $4,9E12$, aproximadamente $5E12$, aproximadamente $5,1E12$, aproximadamente $5,3E12$, aproximadamente $5,5E12$, aproximadamente $5,7E12$, aproximadamente $5,9E12$, aproximadamente $6E12$, aproximadamente $6,1E12$, aproximadamente $6,3E12$, aproximadamente $6,5E12$, aproximadamente $6,7E12$, aproximadamente $6,9E12$, aproximadamente $7E12$, aproximadamente $7,1E12$, aproximadamente $7,3E12$, aproximadamente $7,5E12$, aproximadamente $7,7E12$, aproximadamente $7,9E12$, aproximadamente $8E12$, aproximadamente $8,1E12$, aproximadamente $8,3E12$, aproximadamente $8,5E12$, aproximadamente $8,7E12$, aproximadamente $8,9E12$, aproximadamente $9E12$, aproximadamente $9,1E12$, aproximadamente $9,3E12$, aproximadamente $9,5E12$, aproximadamente $9,7E12$, aproximadamente $9,9E12$, aproximadamente $10E12$, aproximadamente $10,1E12$, aproximadamente $10,3E12$, aproximadamente $10,5E12$, aproximadamente $10,7E12$, aproximadamente $10,9E12$, aproximadamente $11E12$, aproximadamente $11,5E12$, aproximadamente $12E12$, aproximadamente $12,5E12$, aproximadamente $13E12$, aproximadamente $13,5E12$, aproximadamente $14E12$, aproximadamente $14,5E12$, aproximadamente $15E12$, aproximadamente $15,5E12$, aproximadamente $16E12$, aproximadamente $16,5E12$, aproximadamente $17E12$, aproximadamente $17,5E12$, aproximadamente $18E12$, aproximadamente $18,5E12$, aproximadamente $19E12$, aproximadamente $19,5E12$, aproximadamente $20E12$, aproximadamente $20,5E12$, aproximadamente $30E12$, aproximadamente $30,5E12$, aproximadamente $40E12$, aproximadamente $40,5E12$, aproximadamente $50E12$, aproximadamente $50,5E12$, aproximadamente $60E12$, aproximadamente $60,5E12$, aproximadamente $70E12$, aproximadamente $70,5E12$, aproximadamente $80E12$, aproximadamente $80,5E12$, aproximadamente $90E12$, aproximadamente $95E12$ o aproximadamente $100E12$, en donde E es una forma abreviada de base 10 para exponenciación, y xEy se refiere a x multiplicado por base 10 a la potencia/exponente y.

En algunos casos, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción comprenden virus recombinantes de al menos $5E11$, al menos $5,5E11$, al menos $6E11$, al menos $6,5E11$, al menos $7E11$, al menos $7,5E11$, al menos $8E11$, al menos $8,5E11$, al menos $9E11$, al menos $9,5E11$, al menos $10E11$, al menos $1E12$, al menos $1,3E12$, al menos $1,5E12$, al menos $2E12$, al menos $2,1E12$, al menos $2,3E12$, al menos $2,5E12$, al menos $2,7E12$, al menos $2,9E12$, al menos $3E12$, al menos $3,1E12$, al menos $3,3E12$, al menos $3,5E12$, al menos $3,7E12$, al menos $3,9E12$, al menos $4E12$, al menos $4,1E12$, al menos $4,3E12$, al menos $4,5E12$, al menos $4,7E12$, al menos $4,9E12$, al menos $5E12$, al menos $5,1E12$, al menos $5,3E12$, al menos $5,5E12$, al menos $5,7E12$, al menos $5,9E12$,

al menos 6E12, al menos 6,1E12, al menos 6,3E12, al menos 6,5E12, al menos 6,7E12, al menos 6,9E12, al menos 7E12, al menos 7,1E12, al menos 7,3E12, al menos 7,5E12, al menos 7,7E12, al menos 7,9E12, al menos 8E12, al menos 8,1E12, al menos 8,3E12, al menos 8,5E12, al menos 8,7E12, al menos 8,9E12, al menos 9E12, al menos 9,1E12, al menos 9,3E12, al menos 9,5E12, al menos 9,7E12, al menos 9,9E12, al menos 10E12, al menos 10,1E12, al menos 10,3E12, al menos 10,5E12, al menos 10,7E12, al menos 10,9E12, al menos 11E12, al menos 11,5E12, al menos 12E12, al menos 12,5E12, al menos 13E12, al menos 13,5E12, al menos 14E12, al menos 14,5E12, al menos 15E12, al menos 15,5E12, al menos 16E12, al menos 16,5E12, al menos 17E12, al menos 17,5E12, al menos 18E12, al menos 18,5E12, al menos 19E12, al menos 19,5E12, al menos 20E12, al menos 20,5E12, al menos 30E12, al menos 30,5E12, al menos 40E12, al menos 40,5E12, al menos 50E12, al menos 50,5E12, al menos 60E12, al menos 60,5E12, al menos 70E12, al menos 70,5E12, al menos 80E12, al menos 80,5E12, al menos 90E12, al menos 95E12 o al menos 100E12 genomas de vector, en donde E es una forma abreviada de base 10 para exponenciación, y en donde xEy se refiere a x multiplicado por base 10 a la potencia/exponente y.

En algunos casos, el vector viral de la descripción se mide mediante el uso de la multiplicidad de infección (MOI). En algunos casos, la MOI se refiere a la relación o múltiplo de genomas de vector o virales a las células a las que puede suministrarse el ácido nucleico. En algunos casos, la MOI es 1×10^6 . En algunos casos, los virus recombinantes de la descripción pueden ser al menos 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} y 1×10^{18} MOI. En algunos casos, los virus recombinantes de esta descripción pueden ser 1×10^8 a 1×10^{15} MOI. En algunos casos, los virus recombinantes de la descripción pueden ser como máximo 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} y 1×10^{18} MOI.

En algunos casos, el ácido nucleico puede suministrarse sin el uso de un virus (es decir, con un vector no viral) y puede medirse como la cantidad de ácido nucleico. Generalmente, puede usarse cualquier cantidad adecuada de ácido nucleico con las composiciones farmacéuticas y métodos de esta descripción. En algunos casos, el ácido nucleico es al menos 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 pg, 10 pg, 100 pg, 200 pg, 300 pg, 400 pg, 500 pg, 600 pg, 700 pg, 800 pg, 900 pg, 1 µg, 10 µg, 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng, 400 ng, 500 ng, 600 ng, 700 ng, 800 ng, 900 ng, 1 mg, 10 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg 1 g, 2 g, 3 g, 4 g o 5 g. En algunos casos, el ácido nucleico puede ser como máximo aproximadamente 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 pg, 10 pg, 100 pg, 200 pg, 300 pg, 400 pg, 500 pg, 600 pg, 700 pg, 800 pg, 900 pg, 1 µg, 10 µg, 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng, 400 ng, 500 ng, 600 ng, 700 ng, 800 ng, 900 ng, 1 mg, 10 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1 g, 2 g, 3 g, 4 g o 5 g.

En algunos casos, puede usarse un vector autocomplementario (sc). El uso de vectores de AAV autocomplementarios puede eludir el requisito de síntesis de ADN de segunda hebra viral y puede conducir a una mayor tasa de expresión de la proteína transgénica, según lo proporcionado por Wu, Hum Gene Ther. 2007, 18(2):171-82.

En algunos aspectos, pueden generarse varios vectores de AAV para permitir la selección del serotipo y promotor más óptimos para su uso con el transgén anti-VEGF.

En algunos casos, el vector puede ser un vector dirigido, especialmente un rAAV dirigido (por ejemplo, AAV2.7m8) que muestra una mayor infectividad de una célula específica, tal como las células retinianas, o un fotorreceptor, una célula ganglionar retiniana, una célula de Müller, una célula bipolar, una célula amacrina, una célula horizontal o una célula del epitelio pigmentado retiniano. Los vectores virales para su uso en la descripción pueden incluir aquellos que exhiben baja toxicidad y/o baja inmunogenicidad en un sujeto y expresan cantidades terapéuticamente eficaces de un transgén anti-VEGF en un sujeto, por ejemplo, un paciente humano.

En la presente descripción se describen composiciones farmacéuticas y métodos para suministrar un ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF en una célula retiniana objetivo de un sujeto mediante el uso de un rAAV que comprende una variante de la proteína de la cápside 7m8, o rAAV2.7m8, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un transgén anti-VEGF en un primate no humano o en un sujeto humano. En algunos casos, el suministro de un agente anti-VEGF mediante la terapia génica puede usarse para mejorar o prevenir, al menos parcialmente, una enfermedad o afección ocular descrita en la presente descripción.

En algunos casos, el aumento de la infectividad de las células retinianas de la variante de rAAV (por ejemplo, la variante 7m8) es de al menos el 5 %, al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 100 % en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original o no modificada correspondiente. En algunos casos, el aumento de la infectividad de las células retinianas es un aumento de 5 % a 100 %, de 5 % a 95 %, de 5 % a 90 %, de 5 % a 85 %, de 5 % a 80 %, de 5 % a 75 %, de 5 % a 70 %, de 5 % a 65 %, de 5 % a 60 %, de 5 % a 55 %, de 5 % a 50 %, de 5 % a 45 %, de 5 % a 40 %, de 5 % a 35 %, de 5 % a 30 %, de 5 % a 25 %, de 5 % a 20 %, de 5 % a 15 %, de 5 % a 10 % en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original o no modificada correspondiente.

En algunos casos, el aumento de la infectividad de las células retinianas de una variante de rAAV es al menos 1 vez, al menos 1,1 veces, al menos 1,2 veces, al menos 1,3 veces, al menos 1,4 veces, al menos 1,5 veces, al menos 1,6 veces, al menos 1,7 veces, al menos 1,8 veces, al menos 1,9 veces o al menos 2 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original o no modificada correspondiente. En algunos casos, el aumento de la infectividad es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, o al menos 10 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente. En algunos casos, el aumento de la infectividad es al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 35 veces, al menos 40 veces, al menos 45 veces, al menos 50 veces, al menos 55 veces, al menos 60 veces, al menos 65 veces, al menos 70 veces, al menos 75 veces, al menos 80 veces, al menos 85 veces, al menos 90 veces o al menos 100 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original o no modificada correspondiente.

En algunos casos, el aumento de la infectividad de las células retinianas es de entre 10 a 100 veces, entre 10 a 95 veces, entre 10 a 90 veces, entre 10 a 85 veces, entre 10 a 80 veces, entre 10 a 75 veces, entre 10 a 70 veces, entre 10 a 65 veces, entre 10 a 60 veces, entre 10 a 55 veces, entre 10 a 50 veces, entre 10 a 45 veces, entre 10 a 40 veces, entre de 10 a 35 veces, entre 10 a 30 veces, entre 10 a 25 veces, entre 10 a 20 veces, o entre 10 a 15 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original o no modificada correspondiente.

En algunos casos, el aumento de la infectividad de las células de la retina es de entre 2 a 20 veces, entre 2 a 19 veces, entre 2 a 18 veces, entre 2 a 17 veces, entre 2 a 16 veces, entre 2 a 15 veces, entre 2 a 14 veces, entre 2 a 13 veces, entre 2 a 12 veces, entre 2 a 11 veces, entre 2 a 10 veces, entre 2 a 9 veces, entre 2 a 8 veces, entre 2 a 7 veces, entre 2 a 6 veces, entre 2 a 5 veces, entre 2 a 4 veces o entre 2 a 3 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original o no modificada correspondiente.

En algunos casos, una modificación de un aminoácido de una proteína de la cápside descrita en la presente descripción puede conferir un aumento en la capacidad de cruzar una membrana limitante interna (ILM) en un ojo de un primate o sujeto humano en comparación con la capacidad de un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original o no modificada correspondiente para cruzar la ILM en el ojo del sujeto. En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la ILM es un aumento de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 100 % en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original o no modificada correspondiente. En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la ILM es un aumento de 5 % a 100 %, de 5 % a 95 %, de 5 % a 90 %, de 5 % a 85 %, de 5 % a 80 %, de 5 % a 75 %, de 5 % a 70 %, de 5 % a 65 %, de 5 % a 60 %, de 5 % a 55 %, de 5 % a 50 %, de 5 % a 45 %, de 5 % a 40 %, de 5 % a 35 %, de 5 % a 30 %, de 5 % a 25 %, de 5 % a 20 %, de 5 % a 15 %, o de 5 % a 10 % en comparación con la proteína de la cápside de AAV original o no modificada.

En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la ILM es al menos 1 vez, al menos 1,1 veces, al menos 1,2 veces, al menos 1,3 veces, al menos 1,4 veces, al menos 1,5 veces, al menos 1,6 veces, al menos 1,7 veces, al menos 1,8 veces, al menos 1,9 veces o al menos 2 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente. En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la ILM es al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces o al menos 10 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente. En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la ILM es al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, al menos 30 veces, al menos 35 veces, al menos 40 veces, al menos 45 veces, al menos 50 veces, al menos 55 veces, al menos 60 veces, al menos 65 veces, al menos 70 veces, al menos 75 veces, al menos 80 veces, al menos 85 veces, al menos 90 veces o al menos 100 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original o no modificada correspondiente.

En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la ILM es de entre 10 a 100 veces, entre 10 a 95 veces, entre 10 a 90 veces, entre 10 a 85 veces, entre 10 a 80 veces, entre 10 a 75 veces, entre 10 a 70 veces, entre 10 a 65 veces, entre 10 a 60 veces, entre 10 a 55 veces, entre 10 a 50 veces, entre 10 a 45 veces, entre 10 a 40 veces, entre 10 a 35 veces, entre 10 a 30 veces, entre 10 a 25 veces, entre 10 a 20 veces o entre 10 a 15 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original o no modificada correspondiente.

En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la MLI es de entre 2 a 20 veces, entre 2 a 19 veces, entre 2 a 18 veces, entre 2 a 17 veces, entre 2 a 16 veces, entre 2 a 15 veces, entre 2 a 14 veces, entre 2 a 13 veces, entre 2 a 12 veces, entre 2 a 11 veces, entre 2 a 10 veces, entre 2 a 9 veces, entre 2 a 8 veces, entre 2 a 7 veces, entre 2 a 6 veces, entre 2 a 5 veces, entre 2 a 4 veces o entre 2 a 3 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original o no modificada correspondiente.

En algunos casos, el vector puede ser un vector retroviral. Los vectores retrovirales pueden incluir virus de leucemia murina de Moloney y virus basados en VIH. En algunos casos, puede usarse un vector viral basado en VIH, en donde el vector viral basado en VIH comprende al menos dos vectores en donde los genes gag y pol son de un genoma de VIH y el gen env es de otro virus. En algunos casos, pueden usarse vectores virales de ADN. Estos vectores pueden incluir vectores de la viruela tales como los vectores ortopox o avipox, vectores del virus del herpes tales como el vector del virus del herpes simple I (HSV) [Geller, A. I. y otros, J. Neurochem, 64: 487 (1995); Lim, F., y otros, en DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford, Inglaterra) (1995); Geller, A. I. y otros, Proc Natl. Acad. Sci. USA: 90 7603 (1993); Geller, A. I. y otros, Proc Natl. Acad. Sci USA: 87: 1149 (1990)], vectores de adenovirus [LeGal LaSalle y otros, Science, 259: 988 (1993); Davidson y otros, Nat. Genet. 3: 219 (1993)]; Yang y otros, J. Virol. 69: 2004 (1995)] y vectores de virus adenoasociados [Kaplitt, M. G. y otros, Nat. Genet. 8: 148 (1994)].

En algunos casos, el vector puede ser un vector lentiviral. Los vectores lentivirales para su uso en la descripción pueden derivarse de lentivirus humanos y no humanos (lo que incluye el SIV). Los ejemplos de vectores lentivirales pueden incluir secuencias de ácido nucleico necesarias para la propagación del vector, así como también un promotor específico de tejido unido operativamente a un gen de proteína anti-VEGF. Las secuencias de ácido nucleico pueden incluir las LTR virales, un sitio de unión del cebador, un tracto de polipurina, sitios att y un sitio de encapsidación.

En algunos casos, el vector puede ser un vector de alfavirus. Los vectores basados en alfavirus, tales como los creados a partir del virus del bosque semliki (SFV) y el virus sindbis (SIN), también pueden usarse en la descripción. El uso de alfavirus se describe en Lundstrom, K., Intervirology 43: 247-257, 2000 y Perri y otros, Journal of Virology 74: 9802-9807, 2000.

En algunos casos, el vector puede ser un vector viral de la viruela. Los vectores virales de la viruela pueden introducir un gen en el citoplasma de la célula. Los vectores del virus avipox pueden dar como resultado sólo una expresión a corto plazo del gen o ácido nucleico. Los vectores de adenovirus, los vectores de virus adenoasociados y los vectores del virus del herpes simple (HSV) pueden usarse con las composiciones y métodos de la descripción. El vector de adenovirus puede dar como resultado una expresión a más corto plazo (por ejemplo, menos de aproximadamente un mes) que el virus adenoasociado, en algunos aspectos, y puede presentar una expresión mucho más prolongada. El vector particular elegido puede depender de la célula objetivo y de la afección a tratar.

En la presente descripción se describen composiciones y métodos para suministrar un ácido nucleico que codifica un producto génico de interés en una célula objetivo de un sujeto. En algunos casos, el producto génico de interés se suministra al sujeto después de la administración de un vector que comprende el producto génico. En algunos casos, el suministro del producto génico puede usarse para mejorar, al menos parcialmente, o para tratar una enfermedad o afección descrita en la presente descripción. En algunos casos, la composición puede usarse como terapia génica o se adapta para terapia génica o suministro de un anti-VEGF in vivo.

En algunos casos, vector, vehículo de suministro, vehículo de suministro de genes o vehículo de transferencia de genes, se refiere a cualquier macromolécula o complejo de moléculas adecuado que comprenda un polinucleótido a suministrarse a una célula, tejido o sujeto objetivo. En algunos casos, una célula objetivo puede ser cualquier célula a la que se suministra el ácido nucleico o el gen.

En algunos casos, los vectores, por ejemplo, ADN desnudo o un plásmido, pueden suministrarse en una célula, tejido o sujeto mediante el uso de micelas; microemulsiones; liposomas; nanoesferas; nanopartículas; nanocápsulas; nanopartículas de lípidos sólidos; dendrímeros; derivados de polietilénimina y nanotubos de carbono de pared simple; y otros complejos macromoleculares capaces de mediar en el suministro de un polinucleótido a una célula objetivo. En algunos casos, un vector puede ser una molécula orgánica o inorgánica. En algunos casos, un vector es una molécula pequeña (es decir, <5 kD) o una macromolécula (es decir, >5 kD).

En algunos casos, un vector comprende un vector viral recombinante (por ejemplo, vector de rAAV) que incorpora uno o más ácidos nucleicos. Como se describe en la presente descripción, los ácidos nucleicos pueden comprender polinucleótidos. En algunos casos, los ácidos nucleicos comprenden ADN o ARN. En algunos casos, los ácidos nucleicos incluyen ADN o ARN para la expresión de un producto génico o un aptámero. En algunos casos, las moléculas de ARN pueden incluir un transcrito de un gen de interés, intrones, regiones no traducidas, secuencias de terminación y similares. En otros casos, las moléculas de ADN pueden incluir secuencias tales como secuencias de genes promotores híbridos, secuencias promotoras constitutivas fuertes, un gen de interés, regiones no traducidas, secuencias de terminación y similares. En algunos casos, puede usarse cualquier combinación de ADN y ARN.

En algunos casos, la presente descripción proporciona un virus recombinante como vector para mediar en la expresión de un producto génico, o una terapia génica para suministrar un producto génico a células objetivo o a un sujeto in vivo, por ejemplo, un ojo o el vítreo de un ojo. Cualquier vector viral recombinante adecuado puede manipularse por ingeniería genética para optimizarlo para su uso con las composiciones y métodos de la descripción. Por ejemplo, pueden usarse vectores virales recombinantes derivados de adenovirus (Ad) o virus adenoasociados (AAV).

5 Pueden usarse vectores virales tanto humanos como no humanos y el vector viral recombinante puede alterarse de manera que sea defectuoso para la replicación en humanos o en un sujeto. En algunos casos, el vector puede ser un adenovirus o rAAV defectuoso para la replicación, que comprende un polinucleótido que tiene un promotor unido operativamente a un transgén terapéutico que codifica un producto génico o un agente terapéutico, tal como un agente anti-VEGF.

10 En algunos casos, el vector puede ser un vector retroviral. Los vectores retrovirales pueden incluir virus de leucemia murina de Moloney y virus basados en VIH. En algunos casos, puede usarse un vector viral basado en VIH, en donde el vector viral basado en VIH comprende al menos dos vectores en donde los genes gag y pol son de un genoma de VIH y el gen env es de otro virus. En algunos casos, pueden usarse vectores virales de ADN. Estos vectores pueden incluir vectores de la viruela tales como los vectores ortopox o avipox, los vectores del virus del herpes tal como el vector del virus del herpes simple I (VHS) [Geller, A. I. y otros, J. Neurochem, 64: 487 (1995); Lim, F., y otros, en DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford, Inglaterra) (1995); Geller, A. I. y otros, Proc Natl. Acad. Sci. USA: 90 7603 (1993); Geller, A. I. y otros, Proc Natl. Acad. Sci USA: 87: 1149 (1990)], vectores de adenovirus [LeGal LaSalle y otros, Science, 259: 988 (1993); Davidson y otros, Nat. Genet. 3: 219 (1993)]; Yang y otros, J. Virol. 69: 2004 (1995)] y vectores de virus adenoasociados [Kaplitt, M. G. y otros, Nat. Genet. 8: 148 (1994)].

20 En algunos casos, el vector puede ser un vector lentiviral. Los vectores lentivirales para su uso en la descripción pueden derivarse de lentivirus humanos y no humanos (lo que incluye el SIV). Los ejemplos de vectores lentivirales pueden incluir secuencias de ácido nucleico necesarias para la propagación del vector, así como también un promotor específico de tejido unido operativamente a un gen de proteína anti-VEGF. Las secuencias de ácido nucleico pueden incluir las LTR virales, un sitio de unión del cebador, un tracto de polipurina, sitios att y un sitio de encapsidación.

30 En algunos casos, los vectores de adenovirus, los vectores de virus adenoasociados y los vectores del virus del herpes simple (HSV) pueden usarse con las composiciones y métodos de la descripción. El vector particular (por ejemplo, lentivirus, adenovirus o AAV) usado puede depender de la célula objetivo, el tamaño del transgén terapéutico o agente que se va a expresar a partir del vector y/o la afección a tratar.

35 En algunos casos, el vector es un vector de virus adenoasociado (AAV) o se deriva de AAV. Los AAV son pequeños virus de ADN monocatenario sin envoltura. Son parvovirus humanos no patógenos y pueden depender de virus auxiliares, lo que incluye el adenovirus, el virus del herpes simple, el virus vaccinia y el CMV, para la replicación. La exposición a un AAV de tipo silvestre no está asociada ni se conoce que provoque ninguna patología humana y es común en la población general, por lo general se produce en la primera década de vida en asociación con una infección adenoviral.

40 En algunos casos, el rAAV puede ser un AAV nativo o de tipo silvestre del serotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o DJ. En algunos casos, el rAAV puede ser un AAV quimérico que comprende proteínas de la cápside de al menos dos serotipos. En algunos casos, un virus o virión de rAAV puede comprender una variante de la proteína de la cápside de AAV. En algunos casos, la variante de la proteína de la cápside de AAV puede comprender una modificación de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una sustitución, una eliminación y cualquier combinación de las mismas; con respecto a una proteína de la cápside de AAV original correspondiente.

45 En algunos casos, el virión de rAAV puede comprender una eliminación de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15, al menos 16, al menos 17, al menos 18, al menos 19 o al menos 20 aminoácidos en una proteína de la cápside con respecto a una proteína de la cápside de AAV original correspondiente. En algunos casos, el virión de rAAV puede comprender una eliminación de al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95 o al menos 100 aminoácidos en una proteína de la cápside. En algunos casos, el virión de rAAV puede comprender una eliminación de como máximo aproximadamente 100 aminoácidos, como máximo aproximadamente 200, como máximo aproximadamente 300 o como máximo aproximadamente 400 aminoácidos en una proteína de la cápside. En algunos casos, el virión de rAAV puede comprender una eliminación de aproximadamente 1 a aproximadamente 100, de aproximadamente 1 a aproximadamente 90, de aproximadamente 1 a aproximadamente 80, de aproximadamente 1 a aproximadamente 70, de aproximadamente 1 a aproximadamente 60, de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 1 a aproximadamente 40, de aproximadamente 1 a aproximadamente 30, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20, de aproximadamente 1 a aproximadamente 15, de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 aminoácidos en una proteína de la cápside. En algunos casos, el virión de rAAV puede comprender una eliminación de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 20 aminoácidos, de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 19 aminoácidos, de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 18 aminoácidos, de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 17 aminoácidos, de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 16 aminoácidos, de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 15 aminoácidos, de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 14

80, al menos aproximadamente 85, al menos aproximadamente 90, al menos aproximadamente 95 o al menos aproximadamente 100 inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos totales en una proteína de la cápside con respecto a una proteína de la cápside no modificada original correspondiente. En algunos casos, el virión de rAAV puede comprender al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 300 o al menos aproximadamente 400 inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos totales en una proteína de la cápside con respecto a una proteína de la cápside no modificada original correspondiente.

En algunos casos, el virión de rAAV comprende una variante de la proteína de la cápside con una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 86 %, al menos aproximadamente 87 %, al menos aproximadamente 88 %, al menos aproximadamente 89 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 91 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 93 %, al menos aproximadamente 94 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 96 %, al menos aproximadamente 97 %, al menos aproximadamente 98 % o al menos aproximadamente 99 % homóloga a una proteína de la cápside de una proteína de la cápside de AAV no modificada original.

En algunos casos, la modificación puede ser después del aminoácido 587 de AAV2, o el residuo correspondiente de una subunidad de la cápside de otro serotipo de AAV. Cabe señalar que el residuo 587 se basa en una proteína de la cápside de AAV2. También puede incorporarse una modificación en un sitio correspondiente en un serotipo de AAV distinto de AAV2 (por ejemplo, AAV8, AAV9, etc.). Los expertos en la técnica sabrán, basado en una comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de la cápside de diversos serotipos de AAV, dónde estaría un sitio de modificación correspondiente al aminoácido 587 de AAV2 en una proteína de la cápside de cualquier serotipo de AAV dado. Ver, por ejemplo, el núm. de acceso de GenBank NP-049542 para AAV1; núm. de acceso de GenBank AAD13756 para AAV5; núm. de acceso de GenBank AAB95459 para AAV6; núm. de acceso de GenBank YP-077178 para AAV7; núm. de acceso de GenBank YP-077180 para AAV8; núm. de acceso de GenBank AAS99264 para AAV9 y núm. de acceso de GenBank AAT46337 para AAV10.

En algunos casos, la modificación de aminoácidos es una inserción de aproximadamente 5 aminoácidos a aproximadamente 11 aminoácidos en un bucle GH o bucle IV de proteína. En algunos casos, la modificación de aminoácidos es una inserción que comprende uno o más aminoácidos que alteran una región expuesta al solvente de la proteína de la cápside para incluir un bucle GH. En algunos casos específicos, la modificación comprende una inserción de la secuencia de aminoácidos LGETTRP entre los residuos 587 y 588 en VP1 de AAV2. En algunos casos, pueden usarse otras inserciones o variantes de AAV2 como un vector o terapia génica para suministrar un agente anti-VEGF en un sujeto, por ejemplo, sFLT-1, ranibizumab o bevacizumab.

En algunos casos, una modificación de un aminoácido de una proteína de la cápside descrita en la presente descripción puede conferir un aumento en la infectividad de una célula ocular en comparación con la infectividad de la célula retiniana mediante un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original o no modificada correspondiente. En algunos casos, la célula ocular puede ser una célula fotorreceptora (por ejemplo, bastones, conos). En algunos casos, la célula ocular puede ser una célula ganglionar de la retina (RGC). En algunos casos, la célula retiniana puede ser una célula del epitelio pigmentario retiniano (RPE). En algunos casos, la célula ocular puede ser una célula de Müller. En algunos casos, la célula ocular puede ser un astrocito. En algunos casos, las células retinianas pueden incluir células amacrinas, células bipolares o células horizontales.

En algunos casos, el aumento de la infectividad es un aumento de al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 100 % en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente. En algunos casos, el aumento de la infectividad es un aumento entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 95 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 90 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 85 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 80 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 75 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 70 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 65 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 60 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 55 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 45 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 40 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 35 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 % o entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 10 % en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente.

5 En algunos casos, el aumento de la infectividad es al menos aproximadamente 1 vez, al menos aproximadamente 1,1 veces, al menos aproximadamente 1,2 veces, al menos aproximadamente 1,3 veces, al menos aproximadamente 1,4 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 1,6 veces, al menos aproximadamente 1,7 veces, al menos aproximadamente 1,8 veces, al menos aproximadamente 1,9 veces o
10 al menos aproximadamente 2 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente. En algunos casos, el aumento de la infectividad es al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces o al menos aproximadamente 10 veces en comparación con un virión de
15 AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente. En algunos casos, el aumento de la infectividad es al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 35 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 45 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 55 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 65 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 85 veces, al menos aproximadamente 90 veces o al menos aproximadamente 100 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente.

20 En algunos casos, el aumento de la infectividad es de entre aproximadamente 10 a aproximadamente 100 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 95 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 90 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 85 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 80 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 75 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 70 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 65 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 60 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 55 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 50 veces,
25 entre aproximadamente 10 a aproximadamente 45 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 40 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 35 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 30 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 25 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 20 veces o entre aproximadamente 10 a aproximadamente 15 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente.

30 En algunos casos, el aumento de la infectividad es de entre aproximadamente 2 a aproximadamente 20 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 19 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 18 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 17 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 16 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 15 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 14 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 13 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 12 veces, entre
35 aproximadamente 2 a aproximadamente 11 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 9 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 8 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 6 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces o entre aproximadamente 2 a aproximadamente 3 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente.

40 En algunos casos, una modificación de un aminoácido de una proteína de la cápside descrita en la presente descripción puede conferir un aumento en la capacidad de cruzar una membrana limitante interna (ILM) en un ojo de
45 un sujeto en comparación con la capacidad de un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original o no modificada correspondiente para cruzar la ILM en el ojo del sujeto.

50 En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la ILM es un aumento de al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 100 % en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente. En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la ILM es un aumento entre
55 aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 95 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 90 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 85 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 80 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 75 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 70 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 65 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 60 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 55 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 50 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 45 %, entre
60 aproximadamente 5 % a aproximadamente 40 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 35 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 30 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 25 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 20 %, entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 % o entre aproximadamente 5 % a aproximadamente 10 % en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente.

65

5 En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la ILM es de al menos aproximadamente 1 vez, al menos aproximadamente 1,1 veces, al menos aproximadamente 1,2 veces, al menos aproximadamente 1,3 veces, al menos aproximadamente 1,4 veces, al menos aproximadamente 1,5 veces, al menos aproximadamente 1,6 veces, al menos aproximadamente 1,7 veces, al menos aproximadamente 1,8 veces, al menos aproximadamente 1,9 veces
10 o al menos aproximadamente 2 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente. En algunos casos, el aumento en la capacidad para cruzar la ILM es de al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces o al menos aproximadamente 10 veces en
15 comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente. En algunos casos, el aumento en la capacidad para cruzar la ILM es de al menos aproximadamente 15 veces, al menos aproximadamente 20 veces, al menos aproximadamente 25 veces, al menos aproximadamente 30 veces, al menos aproximadamente 35 veces, al menos aproximadamente 40 veces, al menos aproximadamente 45 veces, al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 55 veces, al menos aproximadamente 60 veces, al menos aproximadamente 65 veces, al menos aproximadamente 70 veces, al menos aproximadamente 75 veces, al menos aproximadamente 80 veces, al menos aproximadamente 85 veces, al menos aproximadamente 90 veces o al menos aproximadamente 100 veces en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente.

20 En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la ILM es de entre aproximadamente 10 a aproximadamente 100 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 95 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 90 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 85 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 80 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 75 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 70 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 65 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 60 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 55 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 50 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 45 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 40 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 35 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 30 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 25 veces, entre aproximadamente 10 a aproximadamente 20 veces o entre aproximadamente 10 a aproximadamente 15 veces en comparación con un
25 virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente.
30

En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la ILM es de entre aproximadamente 2 a aproximadamente 20 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 19 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 18 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 17 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 16 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 15 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 14 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 13 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 12 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 11 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 9 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 8 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 7 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 6 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces, entre aproximadamente 2 a aproximadamente 4 veces, o entre aproximadamente 2 a aproximadamente 3 veces en comparación con un virión de AAV que
35 comprende la proteína de la cápside de AAV original correspondiente.
40

45 Una ventaja de la terapia génica es que requiere la administración menos frecuente de un agente terapéutico tal como un agente anti-VEGF como se describe en la presente descripción y proporciona una liberación prolongada o continua del agente terapéutico en comparación con los métodos convencionales que administran proteínas. La terapia génica que utiliza vectores, por ejemplo, AAV2.7m8, que se dirigen a un tipo de tejido o célula específico de interés también puede minimizar los efectos fuera de objetivo o proporcionar un suministro más dirigido de un agente terapéutico tal como un agente anti-VEGF. Con el suministro prolongado o sostenido del agente anti-VEGF in vivo
50 mediante terapia génica, podría administrarse la composición farmacéutica no más de una vez en al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años.

Agentes Terapéuticos

55 En algunos casos, se usa una terapia génica para suministrar un transgén terapéutico que tiene una actividad anti-VEGF que es adecuada o adaptada para la administración a un ojo o vítreo de un ojo de un primate no humano o un sujeto humano. En algunos casos, el rAAV que comprende una variante de la cápside de (por ejemplo, AAV2.7m8) descrita en la presente descripción comprende una secuencia de ácido nucleico heterólogo que codifica un agente anti-VEGF que se usa para suministrar la secuencia del gen anti-VEGF en las células retinianas tras la inyección intravítrea o subretiniana a un sujeto. En algunos casos, el rAAV que comprende el gen anti-VEGF se formula para
60 terapia génica e inyección intravítrea. En algunos casos, el gen anti-VEGF se refiere a un fragmento funcional o a una variante del mismo. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico de los agentes anti-VEGF, tales como sFLT-1, ranibizumab o bevacizumab, se deriva de su secuencia de aminoácidos, que está fácilmente disponible. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico de los agentes anti-VEGF, tales como sFLT-1, ranibizumab o bevacizumab, se optimiza adicionalmente en codones para mejorar su expresión en un sujeto. En algunos casos, la
65

secuencia de ácido nucleico y/o la secuencia de aminoácidos de un agente anti-VEGF se modifica para potenciar su actividad, expresión, estabilidad y/o solubilidad in vivo.

5 La optimización de codones puede lograrse con cualquier método conocido en la técnica. La optimización de codones se refiere a un proceso de modificación de una secuencia de ácido nucleico para potenciar la expresión de un gen en células huésped u objetivo de interés, por ejemplo, células retinianas humanas, al reemplazar al menos un codón (por ejemplo, aproximadamente o más de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 o más codones) de una secuencia nativa con codones que se usan con mayor frecuencia o se usan con la máxima frecuencia en la célula huésped a la vez que se mantiene la secuencia de aminoácidos nativa. Las tablas de uso de codones están fácilmente disponibles, lo que incluye, por ejemplo, la herramienta de tabla de frecuencia de uso de codones de GenScript en <http://www.genscript.com/tools/codon-frequency-table>; la base de datos de uso de codones en <http://www.kazusa.or.jp/codon/>; y Nakamura, Y., y otros, "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28: 292 (2000).

15 En algunos casos, la secuencia de aminoácidos de un agente anti-VEGF codificado en una terapia génica es al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % o 100 % homóloga a la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los siguientes agentes anti-VEGF: sFLT-1, ranibizumab o bevacizumab. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico usada en una terapia génica o rAAV descrito en la presente descripción se compara con la secuencia de ADNc correspondiente de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de sFLT-1, ranibizumab o bevacizumab, y muestra al menos 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % o 100 % de homología de secuencia entre las secuencias de ácido nucleico de cualquiera de sFLT-1, ranibizumab o bevacizumab. En algunos casos, un anti-VEGF expresado a partir de la terapia génica es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % o 100 % espacialmente homólogo a cualquiera de sFLT-1, ranibizumab o bevacizumab (por ejemplo, en términos de su estructura o conformación secundaria, terciaria y cuaternaria). En algunos casos, el agente anti-VEGF de las composiciones farmacéuticas y los métodos descritos en la presente descripción es como máximo 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % o 100 % espacialmente homólogo a cualquiera de sFLT-1, ranibizumab o bevacizumab usados en el estándar de atención (por ejemplo, estructura o conformación secundaria, terciaria y cuaternaria).

30 En algunos casos, el agente anti-VEGF incluido en una terapia génica basada en un rAAV comprende una variante de la cápside como se describe en la presente descripción (por ejemplo, la variante 7m8), codifica una proteína, una proteína de fusión o un polipéptido que tiene al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 100 % de homología con las secuencias de ADNc correspondientes del agente anti-VEGF (por ejemplo, sFLT-1, ranibizumab o bevacizumab). En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción comprenden sFLT-1, ranibizumab o bevacizumab, o un fragmento funcional o variante o mutante de los mismos. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de sFLT-1, ranibizumab o bevacizumab se modifica o se optimiza en codones para potenciar su actividad, expresión y/o solubilidad in vivo.

45 En algunos casos, AAV2.7m8 se usa como terapia génica o sistema de suministro para cualquiera de sFLT-1, ranibizumab o bevacizumab. AAV2.7m8-sVEGFR-1 se refiere a rAAV2 que comprende la inserción 7m8 entre las posiciones 587 y 588 de la proteína de la cápside VP1 de AAV2 y una secuencia de ácido nucleico que codifica sVEGFR-1. AAV2.7m8-ranibizumab se refiere a rAAV2 que comprende la inserción 7m8 entre las posiciones 587 y 588 de la proteína de la cápside VP1 de AAV2 y una secuencia de ácido nucleico que codifica ranibizumab.

50 La presente descripción contempla métodos y composiciones farmacéuticas como se describe en la presente descripción que comprenden uno o más agentes terapéuticos. En algunos casos, el agente terapéutico es un agente anti-VEGF. En algunos casos, el agente anti-VEGF se expresa a partir de un vector de rAAV o terapia génica, o se suministra en una célula, tejido o sujeto objetivo in vivo. La terapia génica tiene la ventaja de proporcionar el agente terapéutico, por ejemplo, el agente anti-VEGF, durante un período de tiempo prolongado in vivo, lo que reduce la necesidad de inyecciones repetidas en comparación con la administración de una terapia basada en proteínas. 55 Dicha ventaja de la terapia génica puede conducir a un suministro más sostenido del agente terapéutico in vivo, lo que proporciona una mejora con respecto al estándar de atención actual. Adicionalmente, una terapia génica también puede proporcionar un suministro más dirigido del agente terapéutico in vivo, por ejemplo, a las células objetivo, y minimizar los efectos fuera de objetivo.

60 En algunos casos, un producto génico descrito en la presente descripción puede ser un polipéptido que, cuando se expresa, puede dar como resultado una reducción de la neovascularización en el ojo de un sujeto. En algunos casos, el polipéptido expresado puede ser una proteína o un péptido anti-factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o un inhibidor de la angiogénesis.

65 En algunos casos, un producto génico descrito en la presente descripción puede ser un anticuerpo anti-VEGF o un fragmento del mismo que puede dirigirse o al menos inhibir parcialmente el VEGF. En algunos casos, el anticuerpo

puede ser un anticuerpo de longitud completa, que comprende tanto una región variable como una región Fc. En algunos casos, el anticuerpo puede ser un fragmento fv de cadena sencilla. En algunos casos, el anticuerpo puede tener una afinidad de unión definida por un epítipo de VEGF. En algunos casos, el anticuerpo puede tener una Kd de al menos aproximadamente 1 mM, al menos aproximadamente 100 μ M, al menos aproximadamente 10 μ M, al menos aproximadamente 1 μ M, al menos aproximadamente 100 nM, al menos aproximadamente 10 nM, al menos aproximadamente 1 nM, al menos aproximadamente 100 pM, al menos aproximadamente 10 pM o al menos aproximadamente 1 pM. En algunos casos, un agente anti-VEGF se une a un VEGF o VEGFR endógeno más fuerte que el VEGFR o VEGF endógeno correspondiente. Una unión más fuerte del agente anti-VEGF permite que el agente anti-VEGF secuestre el VEGF endógeno o bloquee la interacción de las proteínas endógenas con un VEGFR endógeno.

En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado. En algunos casos, el anticuerpo monoclonal humanizado puede ser rhuMab. En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF puede ser ranibizumab, un fragmento de anticuerpo monoclonal o una variante o fragmento del mismo. En algunos casos, el anticuerpo anti-VEGF puede ser bevacizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante o una variante o fragmento del mismo. En algunos casos, el agente anti-VEGF es PAN-90806, o una variante o fragmento del mismo. En algunos casos, el agente terapéutico es una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más polipéptidos que comprenden un agente anti-VEGF como se describe en la presente descripción, por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal humanizado, una proteína de fusión, un aptámero, etc. En algunos casos, el agente anti-VEGF es un señuelo de receptor soluble que se une a VEGF, o una forma soluble de uno o más receptores de VEGF que pueden secuestrar VEGF in vivo.

En algunos casos, un agente terapéutico descrito en la presente descripción puede ser un ácido nucleico tal como un aptámero, un ARN de interferencia, un ARNm y similares. En algunos casos, el aptámero puede ser pegaptanib. En algunos casos, el agente terapéutico puede ser un esteroide o una molécula pequeña. En algunos casos, el esteroide puede ser un corticosteroide. Los ejemplos de corticosteroides pueden incluir triamcinolona, dexametasona, acetónido de fluocinolona, cortisona, prednisolona, flumetolona y derivados de los mismos. En algunos casos, el esteroide puede ser un esteroide antiinflamatorio.

El virus recombinante, terapia génica, composiciones farmacéuticas y métodos de la presente descripción pueden comprender la secuencia que codifica una proteína anti-VEGF, lo que incluye, pero no se limita a, las proteínas de unión a VEGF o fragmentos funcionales de las mismas descritas en las patentes de Estados Unidos núms. 5,712,380, 5,861,484 y 7,071,159 y también las descritas en la publicación de Estados Unidos Núm. 2014/0371438. En algunos casos, una proteína anti-VEGF incluye la proteína sFLT-1, ranibizumab o bevacizumab como se describe en la presente descripción.

En algunos casos, la terapia génica, las composiciones farmacéuticas y los métodos de la presente descripción pueden comprender la secuencia que codifica una proteína anti-VEGF, por ejemplo, sFlt-1. En algunos casos, un agente anti-VEGF incluye, pero no se limita a, fragmentos funcionales de sFlt-1, lo que incluye secuencias del dominio 2 de sFlt-1 o la secuencia. Un agente anti-VEGF puede incluir secuencias o polipéptidos expresados a partir de ADN que codifica dichas secuencias mediante el uso del código genético, una técnica estándar que entienden los expertos en la técnica.

Como se usa en la presente descripción, "proteína sFlt-1" o "sFlt" o "sVEGFR-1" se usan indistintamente para referirse a una secuencia polipeptídica, o un fragmento funcional o variante de la misma, con al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 81 %, al menos 82 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 85 %, al menos 86 %, al menos 87 %, al menos 88 %, al menos 89 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 100 % de homología a la secuencia de sFLT-1 humana, de manera que la proteína o polipéptido sFlt-1 se une a VEGF y/o al receptor de VEGF in vivo. La Figura 2 ilustra una secuencia de ácido nucleico de sFlt-1. La homología se refiere al % de conservación de residuos de un alineamiento entre dos secuencias (por ejemplo, la proteína sFLT-1 humana de origen natural puede incluir cualquier variante adecuada de sFLT-1, lo que incluye, pero no se limita a, fragmentos funcionales, secuencias que comprenden inserciones, eliminaciones, sustituciones, pseudofragmentos, pseudogenes, variantes de empalme o secuencias optimizadas artificialmente. En algunos casos, la "proteína sFLT-1" es al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % homóloga a la secuencia de la proteína sFLT-1 humana de origen natural. En algunos casos, la "proteína sFLT-1" es como máximo aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % homóloga a la secuencia de la proteína sFLT-1 humana de origen natural. En algunos casos, la "proteína sFLT-1" es al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % espacialmente homóloga a la conformación de la proteína sFLT-1 humana de origen natural. En algunos casos, la "proteína sFLT-1" es como máximo aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % espacialmente homóloga a la conformación de la proteína sFLT-1 humana de origen natural.

En algunos casos, la forma truncada soluble del receptor FLT-1 de VEGF, sFLT-1, es el único inhibidor endógeno conocido de VEGF. sFLT-1 puede generarse mediante corte y empalme de ARN alternativo y carece del dominio

similar a inmunoglobulina proximal a la membrana, la región transmembrana y el dominio de tirosina quinasa intracelular.

5 En algunos casos, la administración de una terapia génica o composición farmacéutica como se describe en la presente descripción que comprende sFLT-1 puede inhibir o reducir el VEGF o su actividad in vivo mediante la unión o el secuestro del VEGF endógeno, o mediante la formación de heterodímeros inactivos con isoformas transmembrana de los receptores de VEGF FLTT-1 y FLK-1/KDR. Estas propiedades de sFLT-1 se han descrito en Kendall y Thomas, 1993; Proc Natl Acad Sci. 90: 10705-10709. En algunos casos, pueden usarse fragmentos
10 funcionales de sFLT-1 en lugar de la proteína de longitud completa. En algunos casos, el dominio de unión a VEGF (dominio 2), o alternativamente KDR u otro miembro de la familia, puede usarse para unirse e inactivar a VEGF.

En algunos casos, los métodos y composiciones farmacéuticas de la presente descripción comprenden un agente anti-VEGF que es bevacizumab o ranibizumab, un fragmento funcional o una variante del mismo. Catt Research, Group; Martin, DF; Maguire, MG; Ying, GS; Grunwald, JE; Fine, SL; Jaffe, GJ (2011). "Ranibizumab and Bevacizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration". New England Journal of Medicine. 364 (20): 1897-1908.
15

Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada de ranibizumab están disponibles públicamente en la base de datos de DrugBank, núm. de acceso DB01270:
20

>Cadena ligera de ranibizumab

DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSR
FSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD

EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
25

>Cadena pesada de ranibizumab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGLEWVGWINTYTGE
PTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHL
30

Las secuencias de aminoácidos de cadena ligera y cadena pesada de bevacizumab están disponibles públicamente en la base de datos de DrugBank, núm. de acceso DB00112 (BTD00087, BIOD00087):

>Cadena Ligera de Bevacizumab
35

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSR
FSGSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLL
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>Cadena pesada de bevacizumab

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGVWINTYTGE
 PTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYHYGSSHWFYFDVWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
 TFPQAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
 KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLL
 YSKLTVDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5 Bevacizumab es un anticuerpo IgG1 monoclonal humanizado recombinante que se une a todas las isoformas de VEGF-A y bloquea la angiogénesis mediante la inhibición de VEGF-A. Los, M.; Roodhart, J. M. L.; Voest, E. E. (2007). "Target Practice: Lessons from Phase III Trials with Bevacizumab and Vatalanib in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer". The Oncologist. 12 (4): 443-50; Shih, T; Lindley, C (Noviembre de 2006). "Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies" Clinical therapeutics. 28 (11): 1779-802.

10 Ranibizumab es un fragmento de anticuerpo monoclonal de isotipo IgG1 kappa humanizado recombinante y se une a todas las isoformas de VEGF-A con una mayor afinidad que bevacizumab. Ranibizumab carece de una región Fc. En algunos casos, un agente anti-VEGF es bevacizumab o ranibizumab, o un fragmento funcional o variante del mismo. En algunos casos, un agente anti-VEGF es al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % o 100 % homólogo a bevacizumab o ranibizumab en la secuencia de aminoácidos y/o ácidos nucleico (por ejemplo, ADNc). En algunos casos, un agente anti-VEGF es como máximo aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % o 100 % homólogo a bevacizumab o ranibizumab en secuencias de aminoácidos y/o ácidos nucleico (por ejemplo, ADNc) conocidas en el campo. En algunos casos, un agente anti-VEGF es al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,9 %, 99,99 % o 100 % espacialmente homólogo a la conformación de la proteína bevacizumab o ranibizumab, lo que incluye las estructuras secundaria, terciaria o cuaternaria.

15 Dada una secuencia de aminoácidos, puede generarse fácilmente la correspondiente secuencia de ADNc o ácido nucleico para su uso en una terapia génica descrita en la presente descripción. Los métodos para la traducción inversa de una secuencia de aminoácidos incluyen la herramienta de traducción inversa de secuencias de proteínas EMBOSS disponible en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>. En algunos casos, se optimizan los codones de una secuencia de ácido nucleico de un agente anti-VEGF mediante el uso de cualquiera de las técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, GenScript Codon Usage Frequency Table Tool en <http://www.genscript.com/tools/codon-frequency-table>; Codon Usage Database at <http://www.kazusa.or.jp/codon/>; y Nakamura, Y., y otros "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28: 292 (2000).

20 Composiciones farmacéuticas

25 En algunos casos, una composición farmacéutica es una formulación que contiene uno o más ingredientes activos, por ejemplo, AAV2.7m8 que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF, o un fragmento o variante del mismo, así como también uno o más excipientes, portadores, estabilizadores o agentes de volumen, que son adecuados para la administración a un paciente humano mediante inyección intravítrea o subretiniana para lograr un efecto terapéutico o profiláctico deseado.

30 En algunos casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden rAAV, o AAV2.7m8 y una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF, se suministran como una solución o suspensión reconstituida. En otros casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden rAAV, o AAV2.7m8 y una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF, se suministran en forma liofilizada y se reconstituyen antes de la administración a un paciente. En algunos casos, el método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección ocular como se describe en la presente descripción comprende primero reconstituir, disolver o solubilizar una composición farmacéutica liofilizada que comprende rAAV (por ejemplo, AAV2.7m8) y una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF en un tampón. En algunos casos, dicha composición farmacéutica liofilizada que comprende rAAV (por ejemplo, AAV2.7m8) y una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF como se describe en la presente descripción, puede comprender además un crioprotector, un tensioactivo, una sal, un estabilizador o cualquier combinación de los mismos.

En algunos casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden rAAV o AAV2.7m8 y una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF se suministran como una suspensión. En algunos casos, la suspensión se refrigera. En algunos casos, la suspensión es una solución. En algunos casos, una solución homogénea que contiene la composición farmacéutica se suministra como una jeringa precargada. En algunos casos, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción se suministran como una suspensión. En algunos casos, la suspensión se refrigera. En algunos casos, el método de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección ocular como se describe en la presente descripción comprende calentar la suspensión refrigerada hasta temperatura ambiente y/o agitar la suspensión para asegurar una distribución uniforme antes de administrar una inyección intravítrea a un paciente. En algunos casos, la suspensión se diluye antes de administrarla a un paciente. En algunos casos, dicha composición farmacéutica comprende un tensioactivo, una sal, un estabilizador o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, una suspensión que contiene la composición farmacéutica se suministra como una jeringa precargada.

En algunos casos, la terapia génica o las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción se proporcionan como una suspensión o como una suspensión refrigerada. En algunos casos, la suspensión comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, tensioactivo, glicerol, tensioactivo no iónico, tampón, glicol, sal y cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, se usan ácido clorhídrico e hidróxido de sodio para ajustar el pH de la solución. En algunos casos, la suspensión refrigerada tiene un pH neutro o un pH de 6,5 a 7,5. En algunos casos, el pH de la suspensión refrigerada es ligeramente básico (por ejemplo, pH de aproximadamente 7,5, 8, 8,2, 8,4, 8,5 o 9). En algunos casos, el pH de la suspensión o solución refrigerada es ligeramente ácido (por ejemplo, pH de aproximadamente 6,5, 6,3, 6,1, 6, 5,5 o 5). En algunos casos, la suspensión refrigerada es una solución. En algunos casos, la suspensión refrigerada comprende micelas. En algunos casos, la suspensión refrigerada se agita antes de la administración.

En algunos casos, una terapia génica que comprende rAAV (por ejemplo, AAV2.7m8) y un agente anti-VEGF como se describe en la presente descripción se suministra como un kit, que comprende una composición farmacéutica liofilizada descrita en la presente descripción y una solución tamponada para disolver, diluir o reconstituir la composición farmacéutica liofilizada. En algunos casos, un kit comprende una composición farmacéutica liofilizada que comprende rAAV (por ejemplo, AAV2.7m8) y una solución para reconstituir la composición farmacéutica a una concentración o volumen deseado. En algunos casos, el kit incluye un tampón que ayuda a prevenir la agregación tras reconstituir la composición farmacéutica descrita en la presente descripción. En algunos casos, la terapia génica que comprende el agente anti-VEGF se proporciona como una suspensión. En algunos casos, la composición farmacéutica se proporciona en una jeringa precargada. En algunos casos, un kit comprende una jeringa de doble cámara en donde una de las cámaras contiene un tampón para disolver o diluir la composición farmacéutica.

En algunos casos, el kit comprende una jeringa para inyección. En algunos casos, la solución reconstituida se filtra antes de la administración. En algunos casos, el kit comprende un filtro o una jeringa con filtro para filtrar la composición farmacéutica en el kit antes de su administración a un paciente.

En algunos casos, para la estabilidad del almacenamiento y la conveniencia de la manipulación, una composición farmacéutica que comprende rAAV (por ejemplo, AAV2.7m8) y una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF como se describe en la presente descripción, puede formularse como un polvo liofilizado o secado al vacío que puede reconstituirse con solución salina, tampón o agua antes de la administración a un sujeto. Alternativamente, la composición farmacéutica puede formularse como una solución o suspensión acuosa. Una composición farmacéutica puede contener viriones o partículas de rAAV que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF como se describe en la presente descripción. En algunos casos, puede usarse un virus o sistema de suministro diferente, por ejemplo, nanopartículas o complejos basados en lípidos, para suministrar la secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF como se describe en la presente descripción. Pueden usarse diversos excipientes, tales como fosfato, PBS o tampón Tris, glicol, glicerol, solución salina, tensioactivo (por ejemplo, plurónico o polisorbato), o cualquier combinación de los mismos, para estabilizar una composición farmacéutica. Adicionalmente, pueden usarse crioprotectores, tales como alcoholes, DMSO, glicerol y PEG, como estabilizadores en las condiciones de congelación o secado de la liofilización, o pueden usarse como estabilizadores para preparar una suspensión refrigerada.

En algunos casos, el liofilizado o una suspensión de la composición farmacéutica que comprende una terapia génica anti-VEGF como se describe en la presente descripción tiene un volumen (o volumen reconstituido) de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 µl. En algunos casos, la forma liofilizada o en suspensión de la composición farmacéutica que comprende una terapia génica anti-VEGF como se describe en la presente descripción tiene un volumen de 0,1 a 0,5 ml, de 0,1 a 0,2 ml, de 0,3 a 0,5 ml, de 0,5-1,0 ml, de 0,5-0,7 ml, de 0,6 a 0,8 ml, de 0,8 a 1 ml, de 0,9 a 1,1 ml, de 1,0 a 1,2 o de 1,0 a 1,5 ml. En otros casos, el volumen reconstituido es no más de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4 o 1,5 ml.

En algunos casos, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción están diseñadas, manipuladas por ingeniería genética o adaptadas para la administración a un primate (por ejemplo, primates no humanos y sujetos humanos) mediante inyección intravítrea o subretiniana. En algunos casos, se formula una

composición farmacéutica que comprende viriones de rAAV que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF para la inyección intravítrea en el ojo de un sujeto. En algunos casos, la composición farmacéutica se formula a una concentración que permite la inyección intravítrea de un volumen no superior a aproximadamente 2, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 μ l. En algunos casos, los métodos de tratamiento descritos en la presente descripción comprenden la inyección intravítrea de un volumen de aproximadamente 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150 μ l de una solución o suspensión que comprende un rAAV (por ejemplo, AAV2.7m8) que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF como se describe en la presente descripción.

En algunos casos, un virión AAV2.7m8 que comprende una secuencia de ácido nucleico del transgén anti-VEGF descrito en la presente descripción puede ser un componente de una composición farmacéutica de terapia génica. En algunos casos, un virión de rAAV de cualquier serotipo que comprenda la variante de la proteína de la cápside 7m8 como se describe en la presente descripción puede usarse para preparar una composición farmacéutica liofilizada o una suspensión de la composición farmacéutica. En algunos casos, el virión de rAAV es rAAV2. En algunos casos, la forma liofilizada o una forma en suspensión de la composición farmacéutica comprende rAAV2 que tiene una variante de la proteína de la cápside 7m8 y una secuencia de ADN que codifica un agente anti-VEGF como se describe en la presente descripción.

En algunos casos, una composición farmacéutica descrita en la presente descripción está adaptada para la terapia génica o para el suministro intravítreo de un agente anti-VEGF como agente terapéutico en pacientes humanos o primates no humanos. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica comprende de 1×10^{10} a 1×10^{13} genomas virales (vg). En algunos casos, una dosis unitaria comprende aproximadamente $2,1 \times 10^{11}$, aproximadamente $2,1 \times 10^{12}$ o aproximadamente $2,1 \times 10^{13}$ genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción es 1×10^{10} a 3×10^{12} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción es 1×10^9 a 3×10^{13} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción es 1×10^{10} a 1×10^{11} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción es 1×10^8 a 3×10^{14} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción es al menos 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} o 1×10^{18} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción es 1×10^{10} a 5×10^{13} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción es como máximo aproximadamente 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} y 1×10^{18} genomas de vector.

En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción puede medirse como pfu (unidades formadoras de placa). En algunos casos, las pfu de la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción pueden ser aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{12} pfu. En algunos casos, las pfu de la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción pueden ser al menos aproximadamente 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} o 1×10^{12} pfu. En algunos casos, las pfu de la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción pueden ser como máximo aproximadamente 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 9×10^{10} , 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 9×10^{11} o 1×10^{12} pfu.

En algunos casos, el vector viral de la descripción puede medirse como genomas de vector (vg). En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción puede ser 1×10^{10} a 1×10^{13} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción puede ser 1×10^9 a 1×10^{14} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción puede ser 1×10^{10} a 1×10^{11} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción puede ser 1×10^8 a 1×10^{15} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción es al menos 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} y 1×10^{18} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción es 1×10^8 a 1×10^{15} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción es como máximo aproximadamente 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} y 1×10^{18} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria es de entre 10^{10} a 10^{11} , de 10^{11} a 10^{12} , de 10^{10} a 10^{12} , de 10^{12} a 10^{13} , de 10^{11} a 10^{13} , de 10^{12} a 10^{13} , de 10^{12} a 10^{14} , de 10^{11} a 10^{14} , de 10^{11} a 10^{15} , de 10^{12} a 10^{15} , de 10^{13} a 10^{14} , de 10^{14} a 10^{15} , de 10^{15} a 10^{16} , de 10^{16} a 10^{17} , de 10^{17} a 10^{18} , de 10^{18} a 10^{19} o de 10^{19} a 10^{20} genomas de vector.

En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción es de entre 1×10^{10} a 2×10^{10} , de 2×10^{10} a 3×10^{10} , de 3×10^{10} a 4×10^{10} , de 4×10^{10} a 5×10^{10} , de 5×10^{10} a 6×10^{10} , de 6×10^{10} a 7×10^{10} , de 7×10^{10} a 8×10^{10} , de 8×10^{10} a 9×10^{10} , de 9×10^{10} a 10×10^{10} , de 1×10^{11} a 2×10^{11} , de 2×10^{11} a 3×10^{11} , de 2×10^{11} a $2,5 \times 10^{11}$, de

2,5×10¹¹ a 3×10¹¹, de 3×10¹¹ a 4×10¹¹, de 4×10¹¹ a 5×10¹¹, de 5×10¹¹ a 6×10¹¹, de 6×10¹¹ a 7×10¹¹, de 7×10¹¹ a 8×10¹¹, de 8×10¹¹ a 9×10¹¹, de 9×10¹¹ a 10×10¹¹, de 1×10¹⁰, a 2×10¹², de 2×10¹² a 3×10¹², de 2,5×10¹² a 3×10¹², de 3×10¹² a 4×10¹², de 4×10¹² a 5×10¹², de 5×10¹² a 6×10¹², de 6×10¹² a 7×10¹², de 7×10¹² a 8×10¹², de 8×10¹² a 9×10¹², de 9×10¹² a 10×10¹², de 1×10¹³ a 2×10¹³, de 2×10¹³ a 3×10¹³, de 3×10¹³ a 4×10¹³, de 4×10¹³ a 5×10¹³, de 5×10¹³ a 6×10¹³, de 6×10¹³ a 7×10¹³, de 7×10¹³ a 8×10¹³, de 8×10¹³ a 9×10¹³ o de 9×10¹³ a 10×10¹³ genomas de vector.

En algunos casos, la dosis unitaria de rAAV de esta descripción es de entre 2×10¹¹ a 8×10¹¹ o de 2×10¹² a 8×10¹² genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de rAAV de esta descripción es de entre 10¹⁰ a 10¹³, de 10¹⁰ a 10¹¹, de 10¹¹ a 10¹², de 10¹² y 10¹³ o de 10¹³ a 10¹⁴ genomas de vector.

En algunos casos, la dosis unitaria de rAAV de esta descripción es de entre 1×10¹⁰ a 2×10¹⁰, de 2×10¹⁰ a 4×10¹⁰, de 3×10¹⁰ a 5×10¹⁰, de 4×10¹⁰ a 6×10¹⁰, de 5×10¹⁰ a 7×10¹⁰, de 6×10¹⁰ a 8×10¹⁰, de 7×10¹⁰ a 9×10¹⁰, de 8×10¹⁰ a 10¹¹, de 1×10¹¹ a 2×10¹¹, de 2×10¹¹ a 4×10¹¹, de 3×10¹¹ a 5×10¹¹, de 4×10¹¹ a 6×10¹¹, de 5×10¹¹ a 7×10¹¹, de 6×10¹¹ a 8×10¹¹, de 7×10¹¹ a 9×10¹¹, de 8×10¹¹ a 10×10¹¹, de 1×10¹² a 3×10¹², de 2×10¹² a 4×10¹², de 3×10¹² a 5×10¹², de 4×10¹² a 6×10¹², de 5×10¹² a 7×10¹², de 6×10¹² a 8×10¹², de 7×10¹² a 9×10¹², de 8×10¹² a 10×10¹², de 1×10¹³ a 5×10¹³, de 5×10¹³ a 10×10¹³, de 10¹² a 5×10¹², de 5×10¹² a 1×10¹³, de 7×10¹² a 1×10¹³, de 8×10¹² a 2×10¹³, de 9×10¹² a 2×10¹³, de 9×10¹² a 2×10¹³, de 9×10¹² a 4×10¹³, de 1×10¹³ a 3×10¹³, de 1×10¹³ a 2×10¹³, de 2×10¹³ a 3×10¹³, de 3×10¹³ a 4×10¹³, de 4×10¹³ a 5×10¹³, de 5×10¹³ a 6×10¹³, de 6×10¹³ a 7×10¹³, de 7×10¹³ a 8×10¹³, de 8×10¹³ a 9×10¹³ o de 8×10¹³ a 1×10¹⁴ genomas de vector.

En algunos casos, se selecciona una cantidad o intervalo menor de genomas de vector para una dosis unitaria para evitar la agregación. En algunos casos, se selecciona una mayor cantidad o intervalo de genomas de vector para una dosis unitaria de modo que pueda usarse un volumen más pequeño para la inyección. Un volumen más pequeño (por ejemplo, menos de 50, 40, 30, 20, 10 o 5 µl) de inyección puede ayudar a reducir los cambios en la presión ocular y otros efectos adversos asociados con la inyección intravítrea. En algunos casos, una mayor concentración de rAAV también ayuda a asegurar el suministro eficiente del transgén terapéutico en las células objetivo.

En algunos casos, una dosis unitaria comprende de 2E12 a 6E12 genomas de vector. En algunos casos, una dosis unitaria comprende aproximadamente 1E12, 1,5E12, 2E12, 2,5E12, 3E12, 3,5E12, 4E12, 4,5E12, 5E12, 5,5E12, 6E12, 6,5E12, 7E12, 7,5E12, 8E12, 8,5E12, 9E12 o 9,5E12 genomas de vector. En algunos casos, una dosis unitaria comprende de 1E12 a 1,5E12, de 1,5E12 a 2E12, de 2E12 a 2,5E12, de 2,5E12 a 3,0E12, de 3,0E12 a 3,5E12, de 3,5E12 a 4,0E12, de 4,0E12 a 4,5E12, de 4,5E12 a 5,0E12, de 5,0E12 a 5,5E12, de 5,5E12 a 6,0E12, de 6,0E12 a 6,5E12, de 6,5E12 a 7,0E12, de 7,0E12 a 7,5E12, de 7,5E12 a 8,0E12, de 8,0E12 a 8,5E12, de 8,5E12 a 9,0E12, de 9,0E12 a 9,5E12 o de 9,5E12 a 10E12 genomas de vector. En algunos casos, una dosis unitaria comprende al menos 1E12, 1,5E12, 2E12, 2,5E12, 3E12, 3,5E12, 4E12, 4,5E12, 5E12, 5,5E12, 6E12, 6,5E12, 7E12, 7,5E12, 8E12, 8,5E12, 9E12 o 9,5E12 genomas de vector. En algunos casos, una dosis unitaria comprende no más de 1E12, 1,5E12, 2E12, 2,5E12, 3E12, 3,5E12, 4E12, 4,5E12, 5E12, 5,5E12, 6E12, 6,5E12, 7E12, 7,5E12, 8E12, 8,5E12, 9E12 o 9,5E12 genomas de vector.

En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la descripción puede medirse mediante el uso de multiplicidad de infección (MOI). En algunos casos, la MOI puede referirse a la relación o múltiplo de genomas de vector o virales a las células a las que puede suministrarse el nucleico. En algunos casos, la MOI puede ser 1×10⁶. En algunos casos, la MOI puede estar entre aproximadamente 1×10⁵ a aproximadamente 1×10⁷. En algunos casos, la MOI puede ser 1×10⁴-1×10⁸. En algunos casos, los virus recombinantes de la descripción pueden ser al menos aproximadamente 1×10¹, 1×10², 1×10³, 1×10⁴, 1×10⁵, 1×10⁶, 1×10⁷, 1×10⁸, 1×10⁹, 1×10¹⁰, 1×10¹¹, 1×10¹², 1×10¹³, 1×10¹⁴, 1×10¹⁵, 1×10¹⁶, 1×10¹⁷ y 1×10¹⁸ MOI. En algunos casos, los virus recombinantes de esta descripción pueden ser de aproximadamente 1×10⁸ a aproximadamente 1×10¹⁵ MOI. En algunos casos, los virus recombinantes de la descripción pueden ser como máximo aproximadamente 1×10¹, 1×10², 1×10³, 1×10⁴, 1×10⁵, 1×10⁶, 1×10⁷, 1×10⁸, 1×10⁹, 1×10¹⁰, 1×10¹¹, 1×10¹², 1×10¹³, 1×10¹⁴, 1×10¹⁵, 1×10¹⁶, 1×10¹⁷ y 1×10¹⁸ MOI. En algunos casos, la MOI es de entre 1×10¹⁰ a 2×10¹⁰, de 2×10¹⁰ a 4×10¹⁰, de 3×10¹⁰ a 5×10¹⁰, de 4×10¹⁰ a 6×10¹⁰, de 5×10¹⁰ a 7×10¹⁰, de 6×10¹⁰ a 8×10¹⁰, de 7×10¹⁰ a 9×10¹⁰, de 8×10¹⁰ a 10¹¹, de 1×10¹¹ a 2×10¹¹, de 2×10¹¹ a 4×10¹¹, de 3×10¹¹ a 5×10¹¹, de 4×10¹¹ a 6×10¹¹, de 5×10¹¹ a 7×10¹¹, de 6×10¹¹ a 8×10¹¹, de 7×10¹¹ a 9×10¹¹, de 8×10¹¹ a 10×10¹¹, de 1×10¹² a 3×10¹², de 2×10¹² a 4×10¹², de 3×10¹² a 5×10¹², de 4×10¹² a 6×10¹², de 5×10¹² a 7×10¹², de 6×10¹² a 8×10¹², de 7×10¹² a 9×10¹², de 8×10¹² a 10×10¹², de 1×10¹³ a 5×10¹³, de 5×10¹³ a 10×10¹³, de 10¹² a 5×10¹², de 5×10¹² a 1×10¹³, de 7×10¹² a 1×10¹³, de 8×10¹² a 2×10¹³, de 9×10¹² a 2×10¹³, de 9×10¹² a 2×10¹³, de 9×10¹² a 4×10¹³, de 1×10¹³ a 3×10¹³, de 1×10¹³, de 2×10¹³, de 2×10¹³ a 3×10¹³, de 3×10¹³ a 4×10¹³, de 4×10¹³ a 5×10¹³, de 5×10¹³ a 6×10¹³, de 6×10¹³ a 7×10¹³, de 7×10¹³ a 8×10¹³, de 8×10¹³ a 9×10¹³ o de 8×10¹³ a 1×10¹⁴.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso ocular incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones, suspensiones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravítrea, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, solución salina tamponada con fosfato (PBS) y/o un agente isotónico, por ejemplo, glicerol. En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad e inyectabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción

contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. En algunos casos, la composición farmacéutica puede incluir un agente isotónico, tal como una sal o glicerol. En algunos casos, se añade un tensioactivo o un estabilizador a la composición farmacéutica para prevenir la agregación.

- 5 En algunos casos, el excipiente puede ser un portador. Un portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, solución salina, etanol o poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares) y cualquier combinación de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos tales como polisorbatos (por ejemplo, Tween™, polisorbato 20, polisorbato 80), dodecilsulfato de sodio (laurilsulfato de sodio), óxido de laurildimetilamina, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), alcoholes polietoxilados, polioxietilensorbitán, octoxinol (Triton X100™), óxido de N,N-dimetildodecilamina-N, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB), éter de laurilpolioxil 10, Brij 721™, sales biliares (desoxicolato de sodio, colato de sodio), ácidos plurónicos (F-68, F-127), aceite de ricino polioxílico (Cremophor™), etoxilato de nonilfenol (Tergitol™), ciclodextrinas y cloruro de etilbencetonio (Hyamine™). La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, cresol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. Puede conseguirse una absorción prolongada de las composiciones internas al incluir en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. En algunos casos, el portador farmacéutico incluye fosfato de sodio, cloruro de sodio, polisorbato y sacarosa. En algunos casos, una composición farmacéutica comprende un tensioactivo, por ejemplo, un tensioactivo no iónico tal como polisorbato, poloxámero o plurónico. En algunos casos, la adición de un tensioactivo no iónico reduce la agregación en una suspensión o solución.
- 25 En algunos casos, las composiciones farmacéuticas útiles para la presente descripción pueden empaquetarse en un kit para facilitar la aplicación de la presente descripción. En algunos aspectos, el presente método proporciona un kit que comprende un ácido nucleico recombinante (por ejemplo, rAAV que comprende la secuencia de ácido nucleico de un agente anti-VEGF) de la descripción. En algunos aspectos, el presente método proporciona un kit que comprende una forma liofilizada de un virus recombinante de la descripción y una solución para reconstituir el virus antes de la administración a un paciente. En algunos casos, el kit comprende una forma en suspensión del virus recombinante de la descripción y una solución para diluir la suspensión. En algunos casos, la suspensión se suministra como una jeringa precargada. En algunos casos, la suspensión o un kit de la misma se refrigera. En algunos casos, la suspensión se calienta hasta temperatura ambiente antes de la administración. En algunos casos, la suspensión se agita para asegurar una distribución uniforme antes de la administración.
- 35 En algunos casos, un kit comprende: un virus recombinante proporcionado en la presente descripción e instrucciones para administrar a un ojo o células retinianas de un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del virus recombinante. En algunos aspectos, el kit comprende sales o soluciones farmacéuticamente aceptables para administrar el virus recombinante. Opcionalmente, el kit puede comprender además instrucciones para parámetros operativos adecuados en forma de una etiqueta o un inserto separado. Por ejemplo, el kit puede tener instrucciones estándar que informen a un médico o técnico de laboratorio cómo preparar una dosis unitaria de virus recombinante a partir de una solución o suspensión y/o cómo reconstituir las composiciones liofilizadas. En algunos casos, opcionalmente, el kit comprende además un dispositivo para la administración, tal como una jeringa, una aguja con filtro, un tubo de extensión, una cánula o un inyector subretiniano.
- 45 En algunos casos, la composición farmacéutica se proporciona como una suspensión refrigerada. En algunos casos, la suspensión refrigerada se proporciona en un kit, que puede incluir una jeringa y/o tampón para la dilución. En algunos casos, la suspensión refrigerada se proporciona como una jeringa precargada.
- 50 En algunos casos, puede usarse cualquier método adecuado en la purificación bioquímica de los virus recombinantes (por ejemplo, rAAV) para su uso en una composición farmacéutica como se describe en la presente descripción. Los virus AAV recombinantes pueden recolectarse directamente de las células o del medio de cultivo que comprende las células. El virus puede purificarse mediante el uso de diversos medios bioquímicos, tales como filtración en gel, filtración, cromatografía, purificación por afinidad, ultracentrifugación en gradiente o métodos de exclusión por tamaño antes de liofilizar o elaborar una suspensión de los virus de rAAV.

Indicaciones

- 60 En algunos casos, el virión de rAAV de cualquier serotipo que comprende una variante de la proteína de la cápside y un transgén terapéutico, o una composición farmacéutica del mismo como se describe en la presente descripción, puede mejorar al menos parcialmente una afección o enfermedad ocular asociada con la neovascularización del ojo, o asociada con la CNV. En algunos casos, se usa un virión de rAAV que comprende una variante de la proteína de la cápside para suministrar un transgén anti-VEGF en el ojo de un sujeto humano.
- 65 Las indicaciones de composiciones farmacéuticas o de terapia génica descritas en la presente descripción incluyen degeneración macular relacionada con la edad (AMD) neovascular (húmeda), edema macular después de la

oclusión de la vena retiniana (RVO), edema macular diabético (DME), oclusión de la vena retiniana y retinopatía diabética (DR) en pacientes con DME. En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción pueden usarse para prevenir o tratar una afección o enfermedad ocular para la que está aprobado o indicado un transgén anti-VEGF. En algunos casos, una terapia génica (por ejemplo, terapia génica basada en AAV2.7m8) se usa para tratar o prevenir una afección o enfermedad ocular que responde a al menos un estándar de atención actual para la afección/enfermedad ocular, lo que incluye, pero no se limita a, CNV, AMD húmeda, AMD seca, edema macular después de RVO, DME y retinopatía diabética en pacientes con DME. En algunos casos, se usa una terapia génica de rAAV para tratar o prevenir cualquier afección o trastorno ocular caracterizado por neovascularización o CNV. En otro aspecto, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción para el tratamiento de enfermedades tales como, por ejemplo: AMD, DME, RVO, enfermedades relacionadas con la angiogénesis, cáncer, enfermedades autoinmunitarias, organismos de enfermedades infecciosas y similares.

En algunos casos, la afección ocular puede ser edema macular diabético. El edema macular diabético (DME) es una inflamación de la retina en la diabetes mellitus debido a la fuga de líquido de los vasos sanguíneos dentro de la mácula. La mácula es la porción central de la retina, una pequeña área rica en conos, las terminaciones nerviosas especializadas que detectan el color y de las que depende la visión diurna. A medida que se desarrolla el edema macular, se produce una visión borrosa en el medio o justo al lado del campo visual central. La pérdida visual por edema macular diabético puede progresar durante un período de meses y hacer que sea imposible enfocar con claridad. Los síntomas comunes de DME son visión borrosa, desprendimientos, visión doble y, finalmente, ceguera si no se trata. En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas como se describen en la presente descripción se usan para tratar el DME.

En algunos casos, la afección ocular puede ser una oclusión de la vena retiniana. La oclusión de las venas retinianas es un bloqueo de las pequeñas venas que transportan la sangre fuera de la retina. La retina es la capa de tejido en la parte posterior del ojo interno que convierte las imágenes de luz en señales nerviosas y las envía al cerebro. La oclusión de la vena retiniana es provocada con mayor frecuencia por el endurecimiento de las arterias (aterosclerosis) y la formación de un coágulo de sangre. El bloqueo de las venas más pequeñas (venas ramificadas o BRVO) en la retina se produce con frecuencia en lugares donde las arterias retinianas que se han engrosado o endurecido por la aterosclerosis se cruzan y ejercen presión sobre una vena retiniana. Los síntomas de la oclusión de las venas retinianas pueden incluir visión borrosa repentina o pérdida de la visión en todo o parte de un ojo. En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas como se describen en la presente descripción se usan para tratar la oclusión de las venas retinianas.

En algunos casos, la afección ocular puede ser neovascularización coroidea (CNV), también conocida como AMD húmeda. La neovascularización coroidea puede implicar el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos que se originan en la coroides a través de una ruptura en la membrana de Bruch hacia el epitelio pigmentario subretiniano (sub-RPE) o el espacio subretiniano, lo que puede ser una causa importante de pérdida visual. La CNV puede crear un deterioro repentino de la visión central, perceptible en unas pocas semanas. Otros síntomas que pueden producirse incluyen alteraciones del color y metamorfopsia (distorsiones en las que las líneas rectas parecen onduladas). La hemorragia de los nuevos vasos sanguíneos puede acelerar la aparición de los síntomas de la CNV. La CNV también puede incluir la sensación de presión detrás del ojo. En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas como se describen en la presente descripción se usan para tratar la NVC o una afección ocular asociada con la neovascularización.

La forma "húmeda" avanzada (neovascular o exudativa) de la AMD es menos común, pero con frecuencia puede provocar una pérdida rápida y a menudo sustancial de la visión central en los pacientes. En la forma húmeda de AMD, la neovascularización coroidea se forma y se desarrolla en una red de vasos que pueden crecer debajo y a través del epitelio pigmentario de la retina. Como esto se acompaña de fuga de plasma y/o hemorragia hacia el espacio subretiniano, podría producirse una pérdida repentina grave de la visión central si esto se produce en la mácula. El término "AMD", si no se especifica lo contrario, puede ser AMD seca o AMD húmeda. La presente descripción contempla el tratamiento o la prevención de AMD, AMD húmeda y/o AMD seca. En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas como se describen en la presente descripción se usan para tratar la AMD.

En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas como se describen en la presente descripción se usan para prevenir o tratar una enfermedad o afección ocular que responde a al menos uno de los estándares de atención actuales o terapias aprobadas, tales como ranibizumab o bevacizumab. En algunos casos, un paciente se ha tratado previamente con ranibizumab, bevacizumab y cualquier otro tratamiento aprobado para la enfermedad o afección ocular, o cualquier combinación de los mismos, antes de recibir o reunir los requisitos para recibir una administración de una terapia génica anti-VEGF.

En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción, es decir, la terapia génica de AAV que comprende un agente anti-VEGF, da como resultado una reducción de la neovascularización o CNV, medida por el porcentaje de lesiones de grado IV después de la formación de CNV de acuerdo con la fotografía de fondo de ojo en color, en al menos 5 %, al menos 6 %, al menos 7 %, al menos 8 %, al

5 menos 9 %, al menos 10 %, al menos 11 %, al menos 12 %, al menos 13 %, al menos 14 %, al menos 15 %, al menos 16 %, al menos 17 %, al menos 18 %, al menos 19 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 100 % en comparación con un control de vehículo o tampón.

10 En algunos casos, los métodos y composiciones farmacéuticas descritos en la presente descripción, es decir, la terapia génica de AAV que comprende un agente anti-VEGF, da como resultado una reducción de la neovascularización o CNV, medida por el porcentaje de lesiones de grado IV después de la formación de CNV de acuerdo con la fotografía de fondo de ojo en color, que es comparable a una terapia aprobada. En algunos casos, la reducción de la CNV, o el efecto terapéutico, dura más con la administración de una terapia génica que comprende un agente anti-VEGF en comparación con una inyección no basada en terapia génica o una inyección de proteínas.

15 En algunos casos, un virión de rAAV o una composición farmacéutica del mismo puede mejorar al menos parcialmente una afección, enfermedad ocular o combinaciones de las mismas. En algunos casos, la afección o enfermedad ocular puede estar asociada con la neovascularización del ojo. En algunos casos, la afección o enfermedad ocular es cualquier afección o enfermedad que responda o que pueda tratarse con un agente anti-VEGF de la presente descripción.

20 En algunos casos, una terapia génica como se describe en la presente descripción se usa para tratar cualquier enfermedad o afección ocular que implique una neovascularización anormal, por ejemplo, como resultado de una actividad o expresión anormal de VEGF y/o VEGFR, AMD, retinopatía diabética y preeclampsia. En algunos casos, un agente anti-VEGF en una terapia génica es un agente que inhibe o interfiere con un miembro de la familia VEGF en mamíferos, lo que incluye VEGF-A, B, C, D y factor de crecimiento placentario (PIGF), o cualquier combinación o variante de los mismos. En algunos casos, un agente anti-VEGF en una terapia génica es un agente que inhibe o interfiere con cualquiera de las proteínas relacionadas con VEGF, por ejemplo, VEGF-E expresado por algunos virus y VEGF-F que se encuentra en el veneno de algunas serpientes, que también puede tener propiedades terapéuticas para indicaciones adicionales relacionadas con la angiogénesis in vivo. En algunos casos, el agente anti-VEGF también puede interferir, unirse o inhibir el factor de crecimiento placentario (PIGF) in vivo.

30 Métodos de uso

35 En algunos casos, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad ocular patológica relacionada con la angiogénesis, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente eficaz de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción a un sujeto humano que necesita dicho tratamiento. En algunos casos, la enfermedad se selecciona del grupo de enfermedades neovasculares oculares que incluyen degeneración macular relacionada con la edad (AMD), AMD húmeda, AMD seca, neovascularización retiniana, neovascularización coroidea, retinopatía diabética, retinopatía diabética proliferativa, oclusión de la vena retiniana, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de la vena retiniana ramificada, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, retinopatía isquémica y edema retiniano diabético, y cualquier combinación de las mismas.

45 En algunos casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden un rAAV que comprende una variante de la proteína de la cápside (por ejemplo, rAAV.7m8) y una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF se usan para tratar o prevenir la AMD, lo que incluye la AMD seca y la AMD húmeda. En algunos casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden un rAAV que comprende una variante de la proteína de la cápside (por ejemplo, rAAV.7m8) y una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF se usan para tratar o prevenir la CNV, o reducir las lesiones de CNV de grado IV. En algunos casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden un rAAV que comprende una variante de la proteína de la cápside (por ejemplo, rAAV.7m8) y una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF se usan para tratar o prevenir cualquiera de AMD, AMD húmeda, AMD seca, neovascularización retiniana, neovascularización coroidea, retinopatía diabética, retinopatía diabética proliferativa, oclusión de la vena retiniana, oclusión de la vena retiniana central, oclusión de la vena retiniana ramificada, RVO, edema macular diabético, isquemia retiniana diabética, retinopatía isquémica y edema retiniano diabético, DR en pacientes con DME, y cualquier combinación de las mismas.

55 En algunos casos, el método de tratamiento de AMD, DME, RVO o DR comprende el tratamiento previo de un paciente con una terapia aprobada, por ejemplo, inyección de ranibizumab o bevacizumab, antes de administrar una terapia génica que comprende una secuencia de ácido nucleico del agente anti-VEGF, por ejemplo, ranibizumab o bevacizumab, al mismo paciente. En algunos casos, un paciente recibe un tratamiento previo con una terapia aprobada antes de recibir una dosis única de la terapia génica anti-VEGF, como se describe en la presente descripción. En algunos casos, un paciente responde a cualquiera de las inyecciones de ranibizumab o bevacizumab antes de recibir una dosis única de la terapia génica anti-VEGF, como se describe en la presente descripción. En algunos casos, un paciente que responde a cualquiera de ranibizumab o bevacizumab, o que se trató previamente con uno de ranibizumab o bevacizumab, se trata con terapia génica de ranibizumab o bevacizumab, como se describe en la presente descripción, seguida de un período de al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años, o más de 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años durante los cuales el paciente no recibe

ninguno de estos tratamientos para AMD. En algunos casos, después de que un paciente recibe una inyección intravítrea de terapia génica de ranibizumab o bevacizumab, el paciente no comienza a recibir una inyección de proteína de bevacizumab o ranibizumab u otra terapia aprobada hasta que hayan transcurrido al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años.

En algunos casos, la terapia génica de ranibizumab o bevacizumab, o cualquier otra terapia génica anti-VEGF, como se describe en la presente descripción, es una administración única. En algunos casos, después de que un paciente recibe una dosis unitaria de la terapia génica de ranibizumab o bevacizumab descrita en la presente descripción, el paciente no necesita usar ninguna otra terapia basada en proteínas aprobada.

En algunos casos, los pacientes que experimentan efectos adversos asociados con inyecciones repetidas de terapias aprobadas para CNV o AMD, por ejemplo, inflamación o infección bacteriana, pueden ser candidatos para el tratamiento con la terapia génica anti-VEGF, o terapia génica con ranibizumab o bevacizumab, como se describe en la presente descripción. En algunos casos, dichos riesgos son menores en la terapia génica porque requiere solo una inyección en la vida del paciente o se administra no más de una vez en al menos 2, 5, 10, 20, 30, 40 o 50 años. En algunos casos, el tratamiento con la terapia génica anti-VEGF, o la terapia génica con ranibizumab o bevacizumab, como se describe en la presente descripción, puede ser más rentable que las inyecciones basadas en proteínas porque los efectos terapéuticos de una terapia génica pueden durar más y el costo de una inyección única de terapia génica puede ser menor que el costo combinado de múltiples inyecciones repetidas de una proteína.

Además, al no requerir inyecciones repetidas, la terapia génica aborda el desafío de cumplimiento y adherencia del paciente asociado con terapias que requieren inyecciones repetidas, ya que el incumplimiento (por ejemplo, cuando un paciente olvida o pierde una o más inyecciones programadas) puede dar como resultado la pérdida de la visión y el deterioro de la enfermedad o afección ocular. La tasa de incumplimiento y falta de adherencia a los regímenes de tratamiento que requieren viajes repetidos o frecuentes a los consultorios médicos para su administración es mayor entre los pacientes de edad avanzada, que son los más afectados por la AMD. Por lo tanto, el suministro de un agente anti-VEGF en el ojo de un paciente mediante la terapia génica, por ejemplo, como una inyección intravítrea única, puede proporcionar una opción de tratamiento más conveniente para los pacientes y mejorar los resultados de los pacientes al abordar el problema de incumplimiento y la falta de adherencia.

En algunos casos, un método de uso comprende el tratamiento previo de un paciente o sujeto humano con un fármaco aprobado que se considera el estándar de atención actual, por ejemplo, la inyección de ranibizumab o la inyección de bevacizumab, la determinación de la capacidad de respuesta del paciente al ranibizumab o bevacizumab, y la administración de la terapia génica anti-VEGF descrita en la presente descripción al paciente que responde a una terapia aprobada. Determinar la capacidad de respuesta de un paciente a una terapia aprobada o un estándar de atención actual puede incluir, pero no se limita a, análisis de sangre, inmunoensayos, experimentos ex vivo o la administración de la inyección de proteína ranibizumab o bevacizumab al paciente y evaluar la capacidad de respuesta del paciente al ranibizumab o bevacizumab.

En algunos casos, el método de uso de la terapia génica anti-VEGF descrita en la presente descripción incluye reconstituir una forma liofilizada de la composición farmacéutica descrita en la presente descripción (es decir, rAAV2.7m8 que comprende una secuencia de ácido nucleico anti-VEGF) de acuerdo con la etiqueta del fármaco y administrar dicha terapia génica anti-VEGF reconstituida a un sujeto o paciente humano. En algunos casos, el método de uso de la terapia génica anti-VEGF descrita en la presente descripción incluye administrar una suspensión de la composición farmacéutica descrita en la presente descripción de acuerdo con la etiqueta del fármaco y administrar dicha suspensión de terapia génica anti-VEGF a un sujeto o paciente humano. En algunos casos, las etapas adicionales para administrar una suspensión incluyen agitar la suspensión antes de usar y/o calentar la suspensión hasta temperatura ambiente.

En algunos casos, dicho paciente humano se trató previamente con una inyección de proteína aprobada o con el estándar de atención actual, por ejemplo, inyección de ranibizumab o inyección de bevacizumab. En algunos casos, dicho paciente recibe no más de una inyección o administración de la terapia génica rAAV2.7m8-ranibizumab durante al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años; o recibe no más de una inyección o administración de la terapia génica de rAAV2.7m8-ranibizumab en más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años.

En algunos casos, también se describen en la presente descripción métodos para prevenir o tratar una afección o enfermedad ocular, el método comprende administrar a un individuo que lo necesite, por ejemplo, un individuo con una afección o enfermedad ocular que responda a un fármaco aprobado, una cantidad eficaz de un virión de rAAV que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un agente anti-VEGF, por ejemplo, ranibizumab o bevacizumab, como se describe en la presente descripción o una composición farmacéutica del mismo. En algunos casos, el virión rAAV2.7m8-ranibizumab puede administrarse mediante inyección intraocular, inyección intravítrea, inyección subretiniana o mediante cualquier otro modo o vía de administración conveniente en el ojo de un individuo. Otros modos o vías de administración convenientes pueden incluir, por ejemplo, gotas para los ojos, intravenosa, tópica, etc. En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción implican la administración mediante inyección intravítrea.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz", como se describe en la presente descripción, puede ser un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos clínicos. Para inyección directamente en el ojo o inyección intravítrea, una dosis terapéuticamente eficaz puede estar en el orden de 10^{11} a 10^{12} o de 10^{12} a 10^{13} genomas de vector de 7m8-ranibizumab o cualquier otra terapia génica anti-VEGF. En algunos casos, la dosis unitaria o una cantidad terapéuticamente eficaz de 7m8-ranibizumab o cualquier otra terapia génica anti-VEGF es de entre 10^{10} a 10^{11} , de 10^{11} a 10^{12} , de 10^{10} a 10^{12} , de 10^{12} a 10^{13} , de 10^{11} a 10^{13} , de 10^{12} a 10^{14} , de 10^{11} a 10^{14} , de 10^{11} a 10^{15} , de 10^{12} a 10^{15} , de 10^{13} a 10^{14} , de 10^{14} a 10^{15} , de 10^{15} a 10^{16} , de 10^{16} a 10^{17} , de 10^{17} a 10^{18} , de 10^{18} a 10^{19} o de 10^{19} a 10^{20} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de la composición farmacéutica que comprende 7m8-ranibizumab o cualquier otra terapia génica anti-VEGF de la descripción es de entre 1×10^{10} a 2×10^{10} , de 2×10^{10} a 3×10^{10} , de 3×10^{10} a 4×10^{10} , de 4×10^{10} a 5×10^{10} , de 5×10^{10} a 6×10^{10} , de 6×10^{10} a 7×10^{10} , de 7×10^{10} a 8×10^{10} , de 8×10^{10} a 9×10^{10} , de 9×10^{10} a 10×10^{10} , de 1×10^{11} a 2×10^{11} , de 2×10^{11} a 3×10^{11} , de 2×10^{11} a $2,5 \times 10^{11}$, de $2,5 \times 10^{11}$ a 3×10^{11} , de 3×10^{11} a 4×10^{11} , de 4×10^{11} a 5×10^{11} , de 5×10^{11} a 6×10^{11} , de 6×10^{11} a 7×10^{11} , de 7×10^{11} a 8×10^{11} , de 8×10^{11} a 9×10^{11} , de 9×10^{11} a 10×10^{11} , de 1×10^{12} a 2×10^{12} , de 2×10^{12} a 3×10^{12} , de $2,5 \times 10^{12}$ a 3×10^{12} , de 3×10^{12} a 4×10^{12} , de 4×10^{12} a 5×10^{12} , de 5×10^{12} a 6×10^{12} , de 6×10^{12} a 7×10^{12} , de 7×10^{12} a 8×10^{12} , de 8×10^{12} a 9×10^{12} , de 9×10^{12} a 10×10^{12} , de 1×10^{13} a 2×10^{13} , de 2×10^{13} a 3×10^{13} , de 3×10^{13} a 4×10^{13} , de 4×10^{13} a 5×10^{13} , de 5×10^{13} a 6×10^{13} , de 6×10^{13} a 7×10^{13} , de 7×10^{13} a 8×10^{13} , de 8×10^{13} a 9×10^{13} o de 9×10^{13} a 10×10^{13} genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de 7m8-ranibizumab o cualquier otra terapia génica anti-VEGF de esta descripción es de entre $2,1 \times 10^{11}$ o entre $2,1 \times 10^{12}$ genomas de vector. En algunos casos, la dosis unitaria de rAAV de esta descripción es de entre 10^{10} a 10^{13} , entre 10^{10} a 10^{11} , entre 10^{11} a 10^{12} , entre 10^{12} a 10^{13} o entre 10^{13} a 10^{14} genomas de vector.

En algunos casos, la dosis unitaria de 7m8-ranibizumab o cualquier otra terapia génica anti-VEGF de esta descripción es de entre 1×10^{10} a 2×10^{10} , entre 2×10^{10} a 4×10^{10} , entre 3×10^{10} a 5×10^{10} , entre 4×10^{10} a 6×10^{10} , entre 5×10^{10} a 7×10^{10} , entre 6×10^{10} a 8×10^{10} , entre 7×10^{10} a 9×10^{10} , entre 8×10^{10} a 10^{11} , entre 1×10^{11} a 2×10^{11} , entre 2×10^{11} a 4×10^{11} , entre 3×10^{11} a 5×10^{11} , entre 4×10^{11} a 6×10^{11} , entre 5×10^{11} a 7×10^{11} , entre 6×10^{11} a 8×10^{11} , entre 7×10^{11} a 9×10^{11} , entre 8×10^{11} a 10×10^{11} , entre 1×10^{12} a 3×10^{12} , entre 2×10^{12} a 4×10^{12} , entre 3×10^{12} a 5×10^{12} , entre 4×10^{12} a 6×10^{12} , entre 5×10^{12} a 7×10^{12} , entre 6×10^{12} a 8×10^{12} , entre 7×10^{12} a 9×10^{12} , entre 8×10^{12} a 10×10^{12} , entre 1×10^{13} a 5×10^{13} , entre 5×10^{13} a 10×10^{13} , entre 10^{12} a 5×10^{12} , entre 5×10^{12} a 1×10^{13} , entre 7×10^{12} a 1×10^{13} , entre 8×10^{12} a 2×10^{13} , entre 9×10^{12} a 2×10^{13} , entre 9×10^{12} a 2×10^{13} , entre 9×10^{12} a 4×10^{13} , entre 9×10^{12} a 4×10^{13} , entre 1×10^{13} a 3×10^{13} , entre 1×10^{13} a 2×10^{13} , entre 2×10^{13} a 3×10^{13} , entre 3×10^{13} a 4×10^{13} , entre 4×10^{13} a 5×10^{13} , entre 5×10^{13} a 6×10^{13} , entre 6×10^{13} a 7×10^{13} , entre 7×10^{13} a 8×10^{13} , entre 8×10^{13} a 9×10^{13} o entre 8×10^{13} a 1×10^{14} genomas de vector.

En algunos casos, la cantidad total de 7m8-ranibizumab o cualquier otra terapia génica anti-VEGF inyectada en un paciente o sujeto humano en un período de 5 a 10 años es no más de 10^{10} a 10^{13} , 10^{10} a 10^{11} , 10^{11} a 10^{12} , 10^{12} a 10^{13} o 10^{13} a 10^{14} genomas de vector, o no más de 1×10^{10} a 2×10^{10} , 2×10^{10} a 4×10^{10} , 3×10^{10} a 5×10^{10} , 4×10^{10} a 6×10^{10} , 5×10^{10} a 7×10^{10} , 6×10^{10} a 8×10^{10} , 7×10^{10} a 9×10^{10} , 8×10^{10} a 10^{11} , 1×10^{11} a 2×10^{11} , 2×10^{11} a 4×10^{11} , 3×10^{11} a 5×10^{11} , 4×10^{11} a 6×10^{11} , 5×10^{11} a 7×10^{11} , 6×10^{11} a 8×10^{11} , 7×10^{11} a 9×10^{11} , 8×10^{11} a 10×10^{11} , 1×10^{12} a 3×10^{12} , 2×10^{12} a 4×10^{12} , 3×10^{12} a 5×10^{12} , 4×10^{12} a 6×10^{12} , 5×10^{12} a 7×10^{12} , 6×10^{12} a 8×10^{12} , 7×10^{12} a 9×10^{12} , 8×10^{12} a 10×10^{12} , 1×10^{13} a 5×10^{13} , 5×10^{13} a 10×10^{13} , 10^{12} a 5×10^{12} , 5×10^{12} a 1×10^{13} , 7×10^{12} a 1×10^{13} , 8×10^{12} a 2×10^{13} , 9×10^{12} a 2×10^{13} , 9×10^{12} a 2×10^{13} , 9×10^{12} a 4×10^{13} , 1×10^{13} a 3×10^{13} , 1×10^{13} a 2×10^{13} , 2×10^{13} a 3×10^{13} , 3×10^{13} a 4×10^{13} , 4×10^{13} a 5×10^{13} , 5×10^{13} a 6×10^{13} , 6×10^{13} a 7×10^{13} , 7×10^{13} a 8×10^{13} , 8×10^{13} a 9×10^{13} o 8×10^{13} a 1×10^{14} genomas de vector.

En algunos casos, la cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción comprende de 2E12 a 6E12 genomas de vector. En algunos casos, una dosis unitaria comprende aproximadamente 1E12, 1,5E12, 2E12, 2,5E12, 3E12, 3,5E12, 4E12, 4,5E12, 5E12, 5,5E12, 6E12, 6,5E12, 7E12, 7,5E12, 8E12, 8,5E12, 9E12 o 9,5E12 genomas de vector. En algunos casos, una dosis unitaria comprende de 1E12 a 1,5E12, de 1,5E12 a 2E12, de 2E12 a 2,5E12, de 2,5E12 a 3,0E12, de 3,0E12 a 3,5E12, de 3,5E12 a 4,0E12, de 4,0E12 a 4,5E12, de 4,5E12 a 5,0E12, de 5,0E12 a 5,5E12, de 5,5E12 a 6,0E12, de 6,0E12 a 6,5E12, de 6,5E12 a 7,0E12, de 7,0E12 a 7,5E12, de 7,5E12 a 8,0E12, de 8,0E12 a 8,5E12, de 8,5E12 a 9,0E12, de 9,0E12 a 9,5E12 o de 9,5E12 a 10E12 genomas de vector. En algunos casos, una dosis unitaria comprende al menos 1E12, 1,5E12, 2E12, 2,5E12, 3E12, 3,5E12, 4E12, 4,5E12, 5E12, 5,5E12, 6E12, 6,5E12, 7E12, 7,5E12, 8E12, 8,5E12, 9E12 o 9,5E12 genomas de vector. En algunos casos, una dosis unitaria comprende no más de 1E12, 1,5E12, 2E12, 2,5E12, 3E12, 3,5E12, 4E12, 4,5E12, 5E12, 5,5E12, 6E12, 6,5E12, 7E12, 7,5E12, 8E12, 8,5E12, 9E12, 9,5E12 o 10E12 genomas de vector.

En algunos casos, se usa una concentración más baja (por ejemplo, genomas de vector) para una dosis unitaria para prevenir la agregación, que puede producirse a concentraciones más altas. En algunos casos, se selecciona una concentración más alta, por ejemplo, genomas de vector más altos, para una dosis unitaria para aumentar la eficacia de la terapia génica, o para maximizar el suministro del transgén anti-VEGF en una inyección o en una administración única de la terapia génica. En algunos casos, concentraciones más altas de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción permiten volúmenes de inyección más pequeños, lo que puede reducir los efectos adversos asociados con la inyección intravítrea, por ejemplo, presión intraocular elevada, inflamación, irritación o dolor.

65

En algunos casos, puede administrarse 7m8-ranibizumab o cualquier otra terapia génica anti-VEGF o una composición farmacéutica de la misma como una dosis simple o una dosis única. En algunos casos, puede emplearse más de una administración para lograr el nivel deseado de expresión génica durante un período sostenido de diversos intervalos, por ejemplo, no más de una vez en al menos 2 años, o al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años. En algunos casos, la inyección intravítrea de 7m8-ranibizumab o cualquier otra terapia génica anti-VEGF elimina la necesidad del paciente de recibir una inyección de proteína aprobada durante al menos 1 año o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30 o más años.

Ejemplos

Ejemplo 1: Evaluación de la eficacia de 7m8-sVEGFR-1 en monos

Objetivo: Evaluar la eficacia de 7m8-sFLT-1 tras la administración intravítrea (IVT) a 2×10^{12} vg para inhibir el desarrollo de neovascularización coroidea (CNV) inducida por fotocoagulación con láser en monos verdes africanos. Un objetivo adicional puede ser evaluar la expresión regional de sFLT-1 en tejidos oculares.

El modelo de lesión de CNV en monos es un modelo de primate estándar generalmente aceptado y ampliamente usado para evaluar la eficacia potencial de las terapias para tratar enfermedades oculares asociadas con la neovascularización, tales como la AMD húmeda.

Reclutamiento de sujetos: Los monos se sometieron a un cribado inicial para evaluar la salud ocular y general mediante tonometría, biomicroscopía con lámpara de hendidura, fundoscopia, fotografía de fondo de ojo en color (CFP), angiografía de fluorescencia (FA) y tomografía de coherencia óptica (OCT). Treinta y nueve animales con hallazgos normales se inscribieron en el estudio y se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos de tratamiento por peso corporal inicial y sexo (Tabla 1). Se aplicó ungüento oftálmico de atropina al 1 % después del examen inicial.

Tabla 1: Asignación de tratamientos

Grupo	N	Tratamiento OU	Vía	Dosis (µl)	Láser OU	Lámpara de hendidura y CFP	FA y OCT	Terminación y recolección de tejidos
1	6	AAV2.7m8-sVEGFR-1	IVT; Día 0	1×100 µl	Día 56	Inicio, días 0 (posinyección), 7, 14, 56 y 84	Inicio, después de la ampolla, día 70 y 84	Día 85
2	6	Vehículo	IVT; Día 0	1×100 µl	Día 56			

* La CFP se realizará adicionalmente el día 21 si las imágenes del día 14 no revelan imágenes claras de ampollas estabilizadas. La lámpara de hendidura se realizó antes del láser el día 56, pero no inmediatamente después de la inyección el día 0.

El día 0 del estudio, los grupos 1-2 de monos recibieron AAV2.7m8-sFLT-1 IVT o vehículo OU de acuerdo con el programa de tratamiento (Tabla 1). Antes de la dosificación IVT, se administró anestesia local tópica (proparacaína al 0,5 %) y los ojos se desinfectaron con betadina al 5 % y se enjuagaron con solución salina normal estéril. Las inyecciones IVT pueden administrarse con una aguja de calibre 31 de 0,5 pulgadas colocada 2 mm por detrás del limbo en el cuadrante temporal inferior, dirigido al vítreo central.

Todas las inyecciones IVT pueden seguirse de la administración tópica de ciprofloxacina al 0,3 % o una solución oftálmica antibiótica equivalente y un ungüento de sulfato de atropina al 1 %.

El día 56, se indujo la CNV entre las arcadas vasculares temporales con quemaduras láser. Un oftalmólogo colocó simétricamente nueve puntos de láser en cada ojo mediante el empleo de un láser Iridex Oculight TX de 532 nm con una duración de láser de 100 ms, tamaño de punto de 50 µm, potencia de 750 mW. Los puntos láser se aplicaron mediante el uso de un lente láser de contacto 0,9x. Un oftalmólogo entrenado mapeó la ubicación objetivo de los puntos láser en imágenes de fondo de ojo en color obtenidas antes del tratamiento con láser (y después de la colocación de la ampolla) como referencia durante la colocación del punto láser. Inmediatamente después del tratamiento con láser se realizó una fotografía de fondo de ojo en color para documentar las lesiones del láser. Se excluyó de los análisis cualquier punto que demostrara hemorragia retiniana/subretiniana grave inmediatamente después del láser. La Figura 1 ilustra una fotografía de fondo de ojo ilustrativa de un ojo de un primate no humano después de la inducción de lesiones de CNV por irradiación con láser.

Se capturaron imágenes bilaterales del fondo de ojo en color de la retina con 50 grados de visión centradas en la fóvea mediante el uso de una cámara retiniana Topcon TRC-50EX con hardware de formación de imágenes digitales Canon 6D y software New Vision Fundus Image Analysis System. La FA se realizó con la administración intravenosa de 0,1 ml/kg de fluoresceína sódica al 10 %. La fuga de fluoresceína en los angiogramas de las lesiones de CNV se calificó (I-IV; Tabla 2) por un oftalmólogo a ciegas que evaluó los compuestos generados después del ajuste uniforme de la intensidad de la imagen. La evaluación de la clasificación de la lesión se confirmó en imágenes del

fondo de ojo por otros dos oftalmólogos entrenados. El análisis de densitometría de fluorescencia de imágenes de angiogramas sin procesar de etapa tardía también puede realizarse con el software ImageJ.

Tabla 2: Escalas de clasificación de lesiones por láser

Grado de lesión	Definición
I	Sin hiperfluorescencia: Comparar antes de la FA con 30 s después de la FA. Buscar ausencia de hiperfluorescencia en la lesión
II	Hiperfluorescencia sin fuga - Comparar FA de 30 s con FA de 3 y 6 min. Buscar hiperfluorescencia sin tinción residual significativa en FA de 6 min.
III	Hiperfluorescencia fuga temprana o tránsito medio y tardía: comparar FA de 30 s con FA de 3 y 6 min. Buscar tinción residual significativa en la lesión en FA de 6 min.
IV	Hiperfluorescencia fuga temprana o tránsito medio y tardía que se extiende más allá de los bordes del área tratada - Comparar FA de 30 s con FA de 3 y 6 min. Buscar tinción constante más allá del borde de la lesión como se observa en FA 30 s.

Los sujetos se evaluaron dos veces al día para determinar el bienestar general. Se realizaron observaciones detalladas una vez por semana. Los pesos corporales se obtuvieron en el momento del cribado inicial y cada dos semanas durante el estudio en vida.

Todos los animales se sacrificaron con pentobarbital después de confirmar la calidad de la formación de imágenes del fondo de ojo el día 85, o poco después, en espera de la revisión de las imágenes. A continuación, se sacrificó a los animales con pentobarbital y se enuclearon los globos. Se recortó el exceso de tejido orbital y los globos OD y OS se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y después se diseccionaron a lo largo de planos de tejido congelado a temperatura ambiente para aislar el vítreo y la retina con subtejidos coroideos. Después de la recolección del vítreo, se tomaron ponches de 5 mm de retina neural con RPE/coroideos de la mácula y las regiones superior, inferior, temporal y nasal. Según lo permitió el espacio, se hicieron ponches periféricos adicionales. La retina con RPE/tejidos coroideos subyacentes de cada ponche se transfirió a criotubos marcados previamente tarados, se pesó y se congeló rápidamente en nitrógeno líquido. Antes y después de la recolección de las biopsias con ponche, se tomó una fotografía de la retina montada plana con indicación de la orientación para documentar las regiones de las que se recolectaron los ponches.

Métodos estadísticos: Se usó la prueba exacta de Fisher para evaluar la incidencia de los diferentes grados de lesión. Se usó un ANOVA de dos vías con medidas repetidas seguidas de la prueba de Tukey-Kramer o un procedimiento de contraste para analizar los datos de área complejo de CNV por OCT y densitometría de imagen del angiograma. Se aplicaron pruebas no paramétricas si los datos no se distribuyen normalmente y tienen una varianza desigual. Se consideró estadísticamente significativo un valor de p de 0,05 o menos.

La Figura 3 ilustra un gráfico del porcentaje de lesiones de grado IV en los días 14 y 28 de animales de los grupos 3 y 4, inyectados por vía intravítrea con AAV2.7m8-sVEGFR-1 o un control de vehículo que comprende solo tampón de formulación. Se indujeron lesiones de CNV mediante irradiación láser inmediatamente después de la inyección en cada grupo de sujetos de prueba, y se usó fotografía de fondo de ojo en color para calificar cada lesión en una escala de I-IV. Los monos tratados con AAV2.7m8-sVEGFR-1 mostraron una ligera disminución en la cantidad de lesiones de grado IV en comparación con la administración de vehículo solo para las imágenes de fondo de ojo recopiladas el día 14 cuando se administraron por vía intravítrea. Los monos tratados con AAV2.7m8-sFLT-1 por vía intravítrea no mostraron una disminución significativa en la cantidad de lesiones de grado IV en comparación con la administración del vehículo solo el día 28.

Ejemplo 2: Evaluación de la eficacia de 7m8-ranibizumab en monos

Se realizaron estudios in vivo similares a los descritos en el Ejemplo 1 en monos mediante el uso del mismo protocolo y AAV2.7m8-ranibizumab, que es un rAAV2 que comprende la secuencia 7m8 insertada entre las posiciones 587 y 588 de la proteína de la cápsida VP1 de AAV2 y una secuencia de ácido nucleico que codifica ranibizumab.

Como se ilustra en la Figura 4, AAV2.7m8-ranibizumab administrado por vía intravítrea previno la aparición de lesiones de CNV de grado IV inducidas por láser. Se administró AAV2.7m8-ranibizumab, ranibizumab solo (control positivo) o control de vehículo que comprende tampón de formulación a ojos de primates no humanos mediante inyección intravítrea a una dosis de 2×10^{12} vg. A continuación, se indujeron lesiones de CNV mediante irradiación con láser en todos los grupos, y se usó fotografía de fondo de ojo en color para calificar cada lesión en una escala de I-IV. A continuación, se promediaron y representaron las mediciones del porcentaje de lesiones de grado IV. AAV2.7m8-ranibizumab redujo significativamente las lesiones de CNV in vivo a niveles comparables al ranibizumab solo en el día 14 (barra gris claro) y en el día 28 (barra gris oscuro).

Estos estudios in vivo en monos sugirieron que AAV2.7m8-ranibizumab puede ser una opción viable de terapia génica para seres humanos.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:
- 5 (a) una variante de rAAV2 que comprende una secuencia de aminoácidos LGETTRP insertada entre las posiciones 587 y 588 de la proteína de la cápside VP1, un ácido nucleico que codifica: (i) una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad con SEQ ID NO: 9; y (ii) una secuencia que tiene al menos 95 % de identidad con SEQ ID NO: 10, y
- 10 (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable;
- para su uso en el método de tratamiento de una enfermedad o afección ocular seleccionada de: degeneración macular relacionada con la edad (AMD) neovascular (húmeda), neovascularización coroidea, edema macular después de la oclusión de la vena retiniana, edema macular diabético (DME), oclusión de la vena retiniana y retinopatía diabética asociada con DME, el método comprende administrar una dosis unitaria de la composición farmacéutica mediante inyección intravítrea a un ojo de un sujeto primate que lo necesite.
- 15 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la dosis unitaria es de entre 1E8 a 3E14 genomas de vector.
- 20 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la dosis unitaria es de entre 1E9 a 3E13 genomas de vector.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la dosis unitaria es de entre 1E10 a 1E13 genomas de vector.
- 25 5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la dosis unitaria es de entre 2E12 a 6E12 genomas de vector.
- 30 6. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el sujeto es un ser humano.
7. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde la afección o enfermedad ocular es neovascularización coroidea o AMD húmeda.
- 35 8. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la administración de la composición da como resultado una reducción en el porcentaje de lesiones de grado IV en al menos un 5 %, o en al menos un 10 %, en comparación con un vehículo de control, según lo medido por fotografía de fondo de ojo en color.
- 40 9. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la dosis unitaria: (a) tiene un volumen que no excede los 100 µl; o (b) tiene un volumen que no excede los 50 µl.
10. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto responde a al menos uno de ranibizumab, bevacizumab y sVEGFR-1.
- 45 11. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sujeto se ha tratado previamente con ranibizumab o bevacizumab.
12. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde: (a) la administración por inyección se produce no más de una vez en al menos 2 años o no más de una vez en al menos 5 años; o (b) la administración es una administración única.
- 50 13. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición farmacéutica es una suspensión.
- 55 14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además: (a) agitar la suspensión para asegurar una distribución uniforme antes de la etapa de administración; y/o (b) calentar la suspensión hasta temperatura ambiente antes de la etapa de administración.
- 60 15. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en donde la suspensión comprende además: (a) un tensioactivo, opcionalmente en donde el tensioactivo se selecciona de polisorbatos, dodecilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio, óxido de lauril dimetilamina, alcoholes polietoxilados, polioxietilensorbitán, octoxinol, Brij, plurónico y aceite de ricino polioxilado; y/o (b) fenol, manitol, sorbitol o cloruro de sodio.
- 65

16. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además administrar una solución antibiótica, por ejemplo, una solución antibiótica que comprende ciprofloxacina o un ungüento de sulfato de atropina después de la inyección.
- 5
17. La composición para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la variante de rAAV2 comprende un ácido nucleico que codifica la secuencia de SEQ ID NO: 9 y la secuencia de SEQ ID NO: 10.

Figura 1

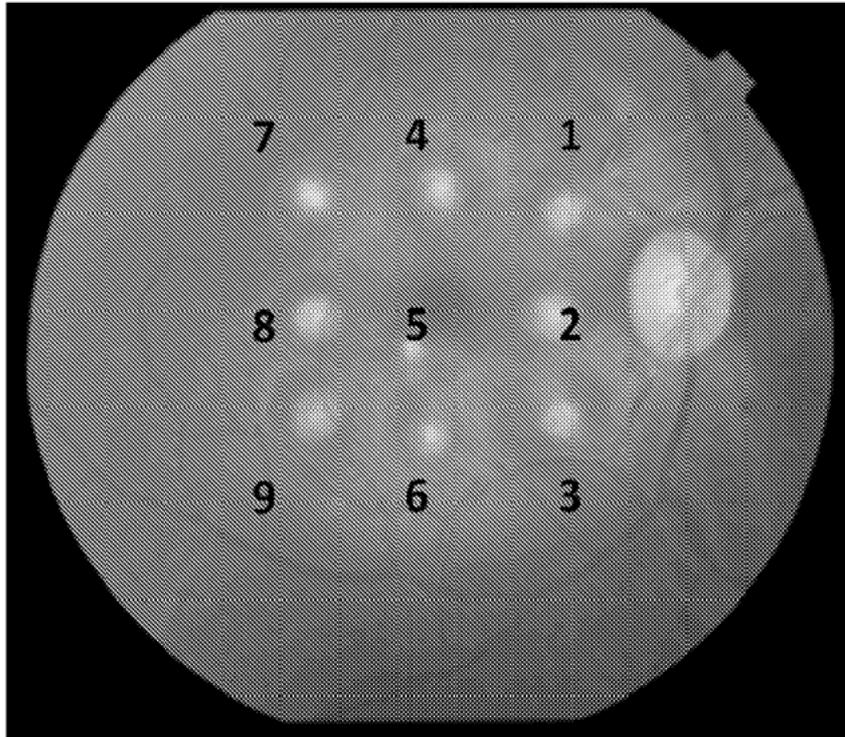
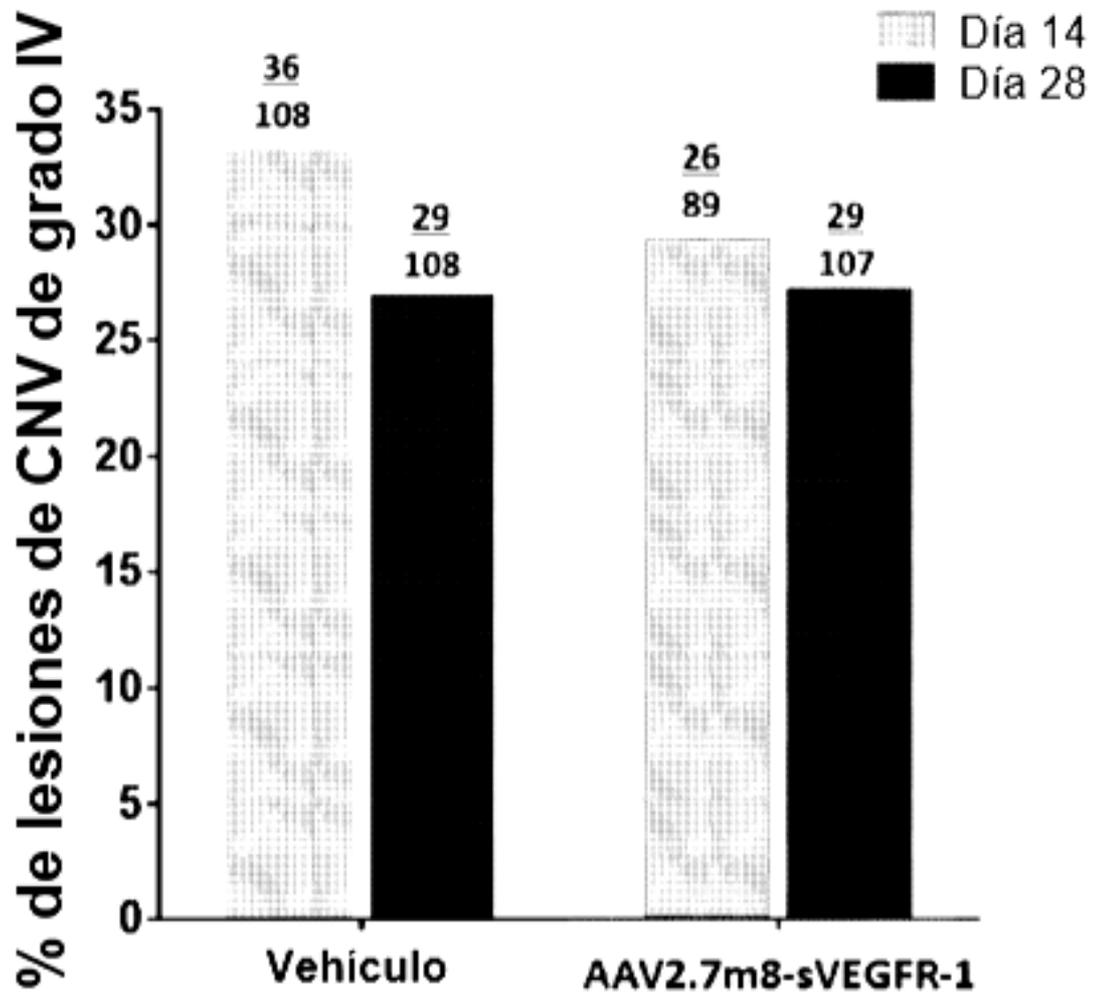


Figura 2

sFl.T-1

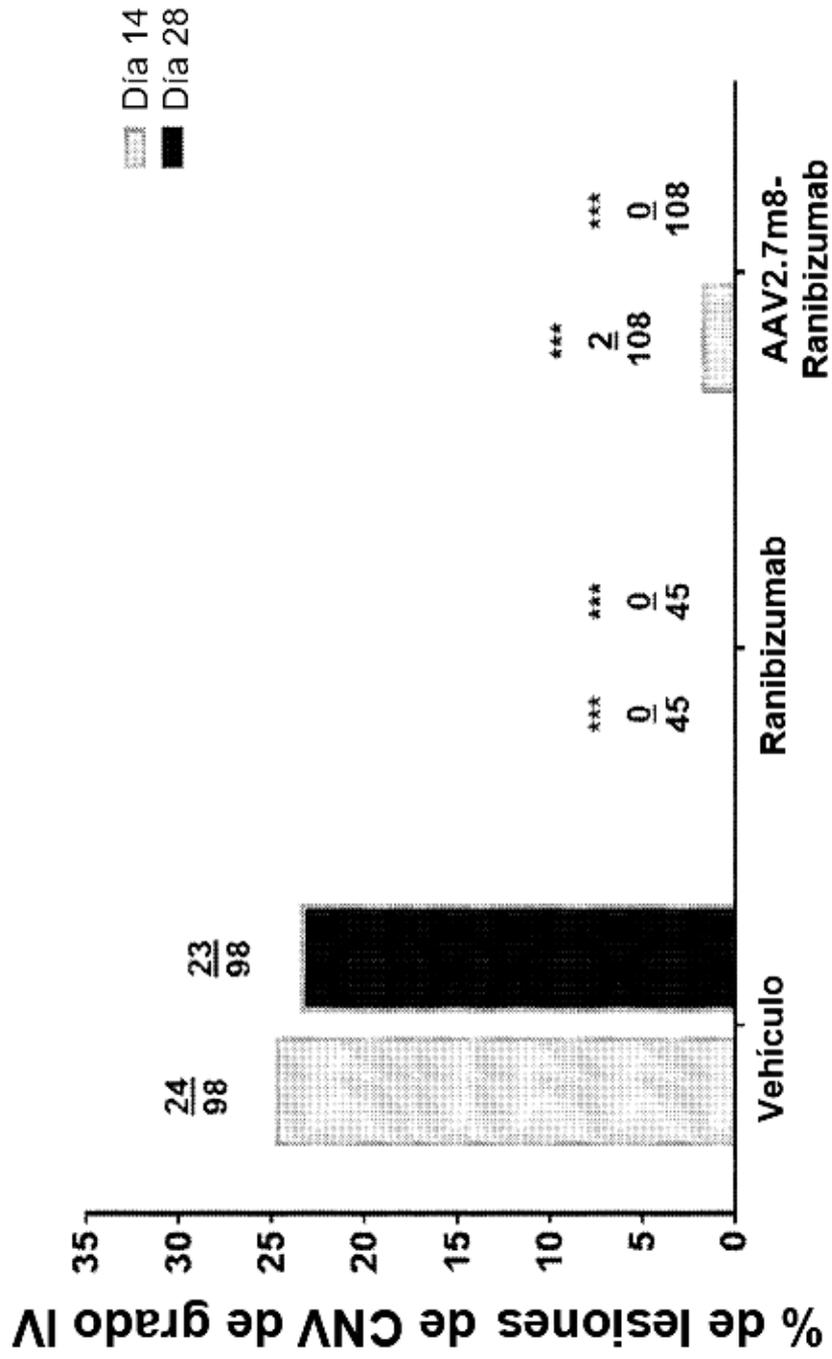
ATGGTCAGCTAC TGGGACACGGGGTCTGCTGTGGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAAATTAAGAAGAT
 CCTGAACGTGAGTTAAAGGGCACCCAGCACATCATGCAAGCAGGCCAGACACTGCATCTCCAATGCAGGGGGGGAAGCAGCCCATAAATGGTC
 TTTGCCCTGAAATGGTGAGTAAGGAAAGCGAAAGGCTGAGCATAACTAAATCTGCCCTGTGGAAGAAATGGCAAACTTTCTGCAGTACTTTAA
 CCTTGAACACAGCTCAAGCAAAACCACTGGCTTCTACAGCTGCAAAATATCTAGCTGTACCTACTTCAAAGAGAAGGAACAGAACTCTGCAA
 TCTATATATTTAGTGATACAGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGAATCCCCGAAATATACACATGACTGACTGAAGGAAGGGAGCTCG
 TCATCCCTGCCGGTTACGTCACCTAACATCACTGTACTTTAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGG
 GACAGTAGAAAAGGGCTTCATCATATACTAAATGCAACGTACAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAA CAGTCAAATGGGCATTTGTATAA
 GACAACCTATCTCACACATCGACAACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAGGCACACCACGCCCAAGTCAAATTACTTAGAGGCCATACTCTT
 GTCCTCAATGTACTGCTACCACTCCCTTGAAACGAGAGTTCAATGACCTGGAGTTACCTGTGAAAAAAATAAGAGAGCTTCCCGTAAGG
 CGACGAATGACCAAAGCAAATCCCATGCCAAACATATCTACAGTGTCTTACTATTGACAAAAATGCAGAAACAAAGACAAAGGACTTTTATACTT
 GTCGTGTAAGGAGTGGACCATCATTCAAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATGATAAAGCATTTCATCACTGTGAAACATCGAAAACAGC
 AAGTCTTGAAACCGTAGCTGGCAAGCGTCTTACCGGCTCTTAIGAAGTGAAGGCAATTCCTCGCCGGAAGTTGTATGGTTAAAAAGATG
 GGTACCTGCGACTGAGAAA TCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTACTCGTTAAATTAACAAGGACGTAACTGAAGAGGATGCAGGGGAATTATA
 CAATCTGCTGAGCATAAACAGTCAAATGTGTTAAAAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCAATGTGAACCCAGATTACGAAAAGGCCGT
 GTCATCGTTCCAGACCCGGCTCTACCCACTGGGCAGCAGACAAATCCTGACTGTACCCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGG
 TTCTGGCACCCCTGTAACCATATCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTCCAAATAATGAAGAGTCCCTTTATCTGGATGCTGACAGCAACA
 TGGGAACAGAAATGAGAGCATCACTCAGCGCATGGCAATAATAGAAGGAAGAATAAGATGGCTAGCACCTGGTTGTGGCTGACTTAGA
 ATTTCTGGAACTACATTTGCATAGCTTCCAATAAAGTTGGGACTGTGGGAAGAAACATAAGCTTTTATATCACAGATGTGCCAAATGGGTTTC
 ATGTTAACTTGGAAAPAAAATGCCGACGGAAAGAGGAGGACCTGAAACTGTCTTGACAGTTAAACAAGTCTTATACAGAGACGTTACTTTGGATT
 TACTCGGACAGTTAATAACAGAAACAATGCCTACAGTATTAGCAAGCAAAAAATGGCCATCACTAAGGAGCACTCCATCACTCTTAATCTTAC
 CATCATGAATGTTTCCCTGCAAGATTGAGGACCTATGCCCTGCAAGCCAGGAATGTATACACAGGGGGAAGAAATCCTCCAGAGAAAGAAA
 TTACAATCAGAGGTGAGCACTGCAACAAAAGGCTGTTTCTCTCGGATCTCCAAATTTAAAAGCAAAAGGAATGATTTGTACCACACAAAAGTA
 ATGTAAAACATTAA

Figura 3



*** P<0,0001 frente a vehículo simultáneo

Figura 4



*** P<0,0001 frente a vehículo simultáneo