

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 840 059**

(51) Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)
A61K 35/761 (2015.01)
A61P 27/02 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.06.2017 PCT/US2017/038003**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **21.12.2017 WO17218974**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2017 E 17814223 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.10.2020 EP 3471780**

(54) Título: **Tratamiento de la DMRE mediante el uso de la variante AAV2 con afibercept**

(30) Prioridad:

16.06.2016 US 201662351234 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.07.2021

(73) Titular/es:

**ADVERUM BIOTECHNOLOGIES, INC. (100.0%)
1035 O'Brien Drive Suite A
Menlo Park, California 94025, US**

(72) Inventor/es:

**BLUMENKRANZ, MARK y
GASMI, MEHDI**

(74) Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, María Ester

ES 2 840 059 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

Tratamiento de la DMRE mediante el uso de la variante AAV2 con afibbercept

5 Antecedentes de la descripción

El afibbercept es una proteína de fusión recombinante que actúa como un receptor anzuelo para los subtipos A y B del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A y VEGF-B) y el factor de crecimiento placentario (PIGF). Al unirse a estos ligandos, el afibbercept es capaz de evitar que estos ligandos se unan a los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), VEGFR-1 y VEGFR-2, para suprimir la neovascularización y disminuir la permeabilidad vascular. El afibbercept consta del dominio 2 del VEGFR-1 y el dominio 3 del VEGFR-2 fusionado con el fragmento Fc de la IgG1. El afibbercept se comercializa con el nombre comercial EYLEA® (afibbercept), que es una inyección oftálmica intravítreo de la proteína de fusión afibbercept.

15 Los siguientes documentos describen el rAAV2.7m8: (1) WO 2016/141078; (2) Deniz Dalkara y otros, "In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous", Science translational medicine, (2013), páginas 1-11 y (3) US2014294771.

20 Los siguientes documentos describen un agente trampa del VEGF que bloquea la acción del VEGF, pero no describen el rAAV2.7m8: (1) Peter Pechan y otros, "Gene Therapies for Neovascular Age-Related Macular Degeneration", COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN MEDICINE, (2014), vol. 5, no. 7, página a017335; (2) US2014371438; y (3) WO2015058048.

25 Resumen de la descripción

Mientras que el EYLEA® (afibbercept) es el estándar actual de cuidados para el tratamiento de la DMRE húmeda en los pacientes, un método de terapia génica para administrar el afibbercept 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 afibbercept *in vivo* sin requerir 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 cumplimiento del paciente y la exposición a la adherencia asociado con las terapias que requieren inyecciones repetidas, como el no-cumplimiento puede provocar la pérdida de la visión y el deterioro de la enfermedad o afección ocular. La tasa de no-cumplimiento y de no-adherencia de los regímenes de tratamiento que requieren viajes repetidos o frecuentes a los consultorios médicos para la administración es mayor entre los pacientes de edad avanzada, que son los más afectados por la DMRE. El suministro del afibbercept en el ojo de un paciente a través de la terapia génica puede proporcionar así 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 no-cumplimiento y la no-adherencia.

40 La presente descripción se refiere a las composiciones farmacéuticas y los métodos para la prevención o el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) neovascular (húmeda), el edema macular después de la oclusión de la vena retiniana (OVR), el edema macular diabético (EMD), la retinopatía diabética (RD) en pacientes con EMD, la oclusión de la vena retiniana, y las enfermedades o afecciones oculares relacionadas, en un primate o un sujeto humano por la administración intravítreo o subretiniana de una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva de un vector o partículas virales (por ejemplo, rAAV) que comprenden un ácido nucleico que codifica el afibbercept, un fragmento funcional, o una variante del mismo.

45 En algunos aspectos, en la presente se describe un método para tratar una afección o enfermedad ocular, el método que comprende administrar una dosis unitaria de una composición farmacéutica por inyección intravítreo al ojo de un sujeto primate que lo necesita, en donde la composición farmacéutica comprende: (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, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos un 95 % de homología con el afibbercept, y (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, la afección o enfermedad ocular es la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) neovascular (húmeda), el edema macular después de la oclusión de la vena retiniana, el edema macular diabético (EMD) o la retinopatía diabética asociada con el EMD. En algunos casos, la afección o enfermedad ocular es la neovascularización coroidea o la DMRE húmeda. En algunos casos, la dosis unitaria comprende entre 1E12 a 1E13 genomas vectoriales. En algunos casos, la dosis unitaria comprende entre 2E12 a 6E12 genomas vectoriales. En algunos casos, la dosis unitaria comprende un volumen que no supera los 100 µL. En algunos casos, la dosis unitaria comprende un volumen que no supera los 50 µL. En algunos casos, el sujeto es un primate no humano. En algunos casos, el sujeto es un humano. En algunos casos, el sujeto responde al afibbercept. En algunos casos, el sujeto se ha tratado previamente con el afibbercept. En algunos casos, la administración por inyección intravítreo no se produce más de una vez en al menos 2 años. En algunos casos, la administración por inyección intravítreo no se produce más de una vez en al menos 5 años. En algunos casos, la administración por inyección intravítreo es una administración única. En algunos casos, la composición farmacéutica es una suspensión o una suspensión refrigerada. En algunos casos, el método comprende además agitar la suspensión para asegurar una distribución uniforme de la suspensión antes de la etapa

de administración. En algunos casos, el método comprende además calentar la composición farmacéutica a temperatura ambiente antes de la etapa de administración.

En otros aspectos de esta descripción técnica, una composición farmacéutica que comprende una suspensión que además comprende una variante de rAAV2 que comprende una secuencia de aminoácidos LGETTRP insertada entre las posiciones 587 y 588 de una proteína de la cápside VP1, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos 95 % de homología con el afibbercept. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición comprende entre 1E12 a 1E13 genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica comprende 2E12 a 6E12 genomas vectoriales. En algunos casos, un estuche comprende la composición farmacéutica en suspensión y una solución para diluir la composición farmacéutica. En algunos casos, la composición farmacéutica comprende no más de 1 mL. En algunos casos, la composición farmacéutica comprende no más de 0,5-1,0 mL. En algunos casos, la composición farmacéutica comprende menos de o igual a 0,5 mL. En algunos casos, la solución del estuche comprende una solución reguladora, sal, alcohol, un tensioactivo o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, el estuche comprende una jeringa.

En otros aspectos de esta descripción técnica, un método de tratamiento de una afección o enfermedad ocular comprende: agitar una suspensión refrigerada, la suspensión que comprende: una variante de rAAV2 que comprende una secuencia de aminoácidos LGETTRP insertada entre las posiciones 587 y 588 de una proteína de la cápside VP1, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos 95 % de homología con el afibbercept; y administrar un volumen de la suspensión refrigerada en el ojo de un sujeto humano a través de una inyección intravítreo. En algunos casos, el sujeto se caracteriza por haberse tratado previamente con el afibbercept. En algunos casos, el sujeto responde al afibbercept. En algunos casos, la suspensión refrigerada comprende no más de 1 mL de la solución. En algunos casos, la suspensión refrigerada comprende no más de 0,5 mL. En algunos casos, el volumen administrado al sujeto no supera los 50 µL. En algunos casos, el volumen administrado al sujeto no supera los 100 µL. En algunos casos, el volumen comprende una dosis unitaria de entre 1E12 a 1E13 genomas vectoriales. En algunos casos, el volumen comprende una dosis unitaria de entre 2E12 a 6E12 genomas vectoriales. 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 analizar el sujeto para la receptividad al afibbercept antes de administrar la composición. 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 los polisorbatos, dodecilsulfato de sodio, lauril sulfato de sodio, óxido de lauril dimetilamina, alcoholes polietoxilados, polioxietileno sorbitán, octoxinol, Brij, plurónico, y aceite de castor polioxílico. En algunos casos, el excipiente farmacéuticamente aceptable comprende fenol, manitol, sorbitol, o cloruro de sodio. En algunos casos, la afección o enfermedad ocular es la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) neovascular (húmeda), el edema macular después de la oclusión de la vena retiniana, el edema macular diabético (EMD) o la retinopatía diabética asociada con el EMD. En algunos casos, la afección o enfermedad ocular es la neovascularización coroidea o la DMRE húmeda. En algunos casos, el método comprende además calentar la suspensión a temperatura ambiente antes de la administración.

Breve descripción de los dibujos

Las características novedosas de la invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. Una mejor comprensión de las características y las ventajas de la presente invención se obtendrá por referencia a la siguiente descripción detallada en donde se utilizan los principios de la invención, y los dibujos que la acompañan:

La Figura 1 ilustra una imagen ejemplar del fondo de ojo de un primate (mono verde africano) después de la inducción de lesiones NVC por irradiación con láser sin tratamiento. Se indujeron nueve lesiones por la aplicación de un solo láser mediante el uso de irradiación láser de 750 mW, 50 µm, 100 ms para todos los puntos excepto el punto central, que se trató con 400 mW. La fotografía en color del fondo de ojo se realizó inmediatamente después de la irradiación láser para documentar las lesiones con láser.

La Figura 2 ilustra imágenes representativas del fondo de ojo de la angiografía de fluorescencia el día 70 después de la inyección intravítreo (IVT) con el vehículo control que comprende sólo la solución reguladora o AAV2.7m8-afibbercept. Los monos tratados con AAV2.7m8-afibbercept mostraron menos lesiones grado IV y lesiones de menor grado que los monos a los que se les injectó con el vehículo control solamente.

La Figura 3 ilustra el porcentaje de lesiones NVC grado IV en monos después de la inyección intravítreo de EYLEA® (afibbercept), que se usó como control positivo, en comparación con el vehículo control que comprende solución reguladora solamente. El tratamiento con EYLEA® (afibbercept) mostró una disminución significativa en la cantidad de lesiones grado IV en comparación con el vehículo control en base a las imágenes del fondo de ojo recolectadas el día 14 (barra gris claro) y el día 28 (barra gris oscuro).

La Figura 4 ilustra el porcentaje de lesiones NVC grado IV en monos tratados con inyección intravítreo del vehículo control, AAV2.7m8-afibbercept, o AAV2.7m8-sVEGFR-1 en el día 14 (barra gris claro) y el día 28 (barra gris oscuro) después de la inyección intravítreo. Los monos tratados con la inyección intravítreo de AAV2.7m8-afibbercept mostraron una disminución significativa en la cantidad de lesiones grado IV en comparación con los monos tratados con el vehículo control en el día 14 y en el día 28, similar a los resultados del control positivo

ilustrados en la **Figura 3**. El tratamiento con la inyección intravítreo de AAV2.7m8-sVEGFR-1 no mostró ninguna reducción significativa en las lesiones grado IV en comparación con el vehículo control.

La Figura 5 ilustra la secuencia de ácido nucleico del afibbercept.

La Figura 6 ilustra la secuencia de ácido nucleico de la tirosina quinasa-1 soluble tipo fms (sFlt-1 o sVEGFR-1).

La sVEGFR-1 es una variante de empalme del receptor del VEGF 1.

5 Descripción detallada de la divulgación

A continuación, se describen varios aspectos de esta divulgación técnica con referencia a ejemplos de aplicaciones para la 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 pertinente reconocerá fácilmente que las características descritas en la presente descripción pueden practicarse 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 ocurrir 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.

20 La presente divulgación se refiere a las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento o prevención de enfermedades o afecciones oculares que comprenden la administración de una terapia génica, un vector, o un constructo por inyección intravítreo en el ojo de un primate (por ejemplo, un mono o un humano) que comprende una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADNC) que codifica el afibbercept, un fragmento funcional, o una variante del mismo. Tras la inyección intravítreo de una terapia génica, un vector o un constructo que comprende la secuencia de ácido nucleico del afibbercept, un fragmento funcional o la variante del mismo, la secuencia de ácido nucleico se expresa *in vivo*, por ejemplo, en las células de la retina, para generar la proteína de fusión afibbercept, o un fragmento funcional, o una variante del mismo, que produce un efecto terapéutico.

25 En algunas aplicaciones de la invención, se usa una terapia génica, un vector, o un constructo que comprende el afibbercept para tratar o prevenir una o más enfermedades o afecciones oculares, que incluyen, pero no se limitan a, la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) neovascular (húmeda), el edema macular después de la oclusión de la vena retiniana (OVR), el edema macular diabético (EMD) y/o la retinopatía diabética (RD) en pacientes con EMD, la oclusión de la vena retiniana, o cualquier otra enfermedad o afección ocular relacionada que involucre neovascularización (por ejemplo, neovascularización coroidea (CNV)) en un sujeto primate o humano. En algunas aplicaciones de la invención, los métodos descritos en la presente descripción se usan para tratar una enfermedad o afección ocular que responde al afibbercept (por ejemplo, EYLEA®). En algunas aplicaciones de la invención, los métodos descritos en la presente descripción se usan para tratar una enfermedad o afección ocular que responde al estándar de cuidado actual o responde a al menos una de las terapias aprobadas para la DMRE, la OVR, el EMD o la RD en los pacientes con EMD, tal como la inyección de afibbercept, la inyección de ranibizumab, o la inyección de bevacizumab.

30 40 En algunas aplicaciones de la invención, por la administración intravítreo o subretiniana de una composición farmacéutica adaptada o adecuada para la terapia génica, por ejemplo, un virus adenoasociado recombinante (rAAV, por sus siglas en inglés) con una variante de la proteína de la cápside VP1 o modificada, tal como la variante de la cápside 7m8, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o polipéptido que es al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % homóloga al afibbercept. Tal homología puede basarse en la secuencia de ácido nucleico, la secuencia de aminoácidos, la conformación espacial, o la estructura proteica del afibbercept.

45 50 La secuencia de proteína del afibbercept está disponible públicamente en la base de datos del DrugBank, número de acceso DB08885. En algunos casos, el afibbercept se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión, como se divulga en la publicación de patente de Estados Unidos 2014/0371438 (Figura 5).

55 Una ventaja de la terapia génica sobre las inyecciones de proteínas es que la terapia génica proporciona la liberación prolongada o continua de un agente terapéutico (por ejemplo, el afibbercept) y, en algunos casos, no requiere inyecciones múltiples o repetidas. Esta liberación prolongada o sostenida del afibbercept resulta del suministro de una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión afibbercept, que se expresa *in vivo* para proporcionar un efecto terapéutico. En algunos casos, la expresión del afibbercept a partir del ácido nucleico heterólogo suministrado en las células de la retina puede continuar durante al menos 1 año, más de 1 año, durante al menos 2, 3, 4, 5, 10, o más años.

60 65 En algunos casos, un rAAV puede comprender una variante de la proteína de la cápside que aumenta su infectividad de las células o tejido objetivo en un ojo (por ejemplo, las células de la retina), lo que permite un suministro más eficiente de la secuencia de ácido nucleico que codifica un transgén terapéutico como la proteína de fusión afibbercept, o un fragmento funcional o variante del mismo, en las células o tejido objetivo donde el transgén terapéutico puede expresarse durante un período de tiempo (por ejemplo, durante 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 específico o un tipo celular de interés, por ejemplo, las células fotorreceptoras, que pueden ayudar a minimizar los efectos fuera del

objetivo, o proporcionar un suministro más dirigido del transgén terapéutico tal como el afibbercept in vivo.

Con el suministro prolongado o sostenido del afibbercept in vivo a través de la terapia génica, se podría administrar la composición farmacéutica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept, un fragmento funcional, un mutante o una variante del mismo, en menos dosis dentro de un período de tiempo en comparación con el estándar de cuidado actual (por ejemplo, inyecciones de proteínas o tratamientos basados en la terapia no-génica). En algunos casos, el número total de dosis administradas de una terapia génica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept, un fragmento funcional o una variante del mismo, no es más de 1 dosis unitaria en al menos 1,5 años, 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 que codifica el afibbercept, un fragmento funcional o una variante del mismo, es solo una vez 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 el afibbercept, un fragmento funcional o una variante del mismo, puede producir en un paciente un efecto terapéutico que dura más de 1 año, o más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 años. En algunos casos, una terapia génica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept, un fragmento funcional o una variante del mismo, se administra no más de una vez a un paciente en al menos 2 o más años, en al menos 3 o más años, en al menos 4 o más años, en al menos 5 o más años, en al menos 6 o más años, en al menos 7 o más años, en al menos 8 o más años, en al menos 9 o más años, o en al menos 10 o más años. En algunos casos, se administra una terapia génica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept a un paciente que responde al afibbercept o que recibió un pre-tratamiento con EYLEA® antes de recibir la terapia génica descrita en la presente descripción. En algunos casos, un paciente que recibe la terapia génica descrita en la presente (por ejemplo, AAV2.7m8-afibbercept) puede comenzar la terapia con el afibbercept, el ranibizumab, y/o el bevacizumab, según sea necesario, después que hayan transcurrido al menos 2, 3, 4, 5, 10 o más años después de recibir la terapia génica. En algunos casos, la terapia anti-VEGF no es necesaria después de que un paciente recibe un tratamiento con la terapia génica descrita en la presente descripción.

En algunos casos, la administración única de una terapia génica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept, un fragmento funcional o una variante del mismo, obvia la necesidad de que el paciente reciba una inyección de EYLEA® 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 intravítreo de una terapia génica que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept, un fragmento funcional o una variante del mismo, no necesita ninguna inyección adicional del afibbercept durante el resto de la vida del paciente. En otros casos, un paciente que recibe una inyección intravítreo única de la terapia génica del 7m8-afibbercept puede comenzar la terapia con cualquiera de afibbercept, ranibizumab y/o bevacizumab, según sea necesario, al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años después de recibir la terapia génica.

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

Las composiciones y los métodos de esta divulgación como se describen en la presente descripción pueden emplear, a menos que se indique de cualquier otra manera, las técnicas convencionales y descripciones de biología molecular (que incluyen las técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica, inmunobiología y técnicas oftálmicas, que están dentro de la habilidad de aquellos que practican la técnica. Tales técnicas convencionales incluyen los métodos para observar y analizar la retina, o la visión en un sujeto, la clonación y la propagación de virus recombinantes, la formulación de una composición farmacéutica, y purificación bioquímica e inmunobiológica. Pueden obtenerse ilustraciones específicas de técnicas adecuadas haciendo referencia a los ejemplos de la presente descripción. Sin embargo, también pueden usarse, por supuesto, procedimientos convencionales equivalentes. Tales técnicas convencionales y descripciones pueden encontrarse en los manuales de laboratorio estándar 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* (4^a Ed.) WH Freeman, N.Y. (1995); Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" IRL Press, Londres (1984); Nelson y Cox, Lehninger, *Principles of Biochemistry*, 3^a Ed., W.H. Freeman Pub., Nueva York (2000); y Berg y otros, *Biochemistry*, 5^a Ed., W.H. Freeman Pub., Nueva York (2002).

En algunos casos, en la presente descripción se divultan las formulaciones farmacéuticas que comprenden: (a) un virión de un virus adenoasociado recombinante (rAAV2) adaptado para la 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 del LGETTRP entre las posiciones 587 y 588, y en donde la variante de la proteína de la cápside confiere un aumento en la infectividad de una célula ocular con respecto a un virión AAV que comprende una proteína no variante de la cápside de AAV2 correspondiente; y (ii) una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica el afibbercept, un fragmento funcional o variante del mismo; y (b) un excipiente farmacéuticamente

aceptable. En algunos casos, el producto génico que se codifica es una proteína de fusión o un polipéptido que tiene al menos un 95 %, o un 99 % de homología con el afibercept.

5 En la presente descripción también se divultan los métodos de tratamiento de una afección o enfermedad ocular para la que está indicado o aprobado el tratamiento con afibercept, que comprenden administrar una formulación farmacéutica adaptada para la terapia génica, es decir, administrar una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibercept *in vivo*, como se describe en la presente, a un ojo de un sujeto por inyección intravítreo.

10 También se divultan en la presente descripción las composiciones farmacéuticas que comprenden una terapia génica o un vector que codifica una proteína de fusión o un polipéptido que tiene al menos un 95 %, o un 99 % de homología con el afibercept que puede liofilizarse, o suministrarse en forma de suspensión. En algunos casos, se proporciona una forma liofilizada o una suspensión de la composición farmacéutica en un estuche con una solución reguladora para reconstituir la composición farmacéutica o para diluirla, respectivamente.

15 También se divultan en la presente descripción las composiciones farmacéuticas que comprenden una terapia génica o un vector que codifica una proteína de fusión o un polipéptido que tiene al menos un 95 %, o un 99 % de homología con el afibercept que se suministra como una suspensión refrigerada. En algunos casos, se proporciona una suspensión refrigerada de la composición farmacéutica en un estuche con una solución reguladora para diluir la composición farmacéutica.

20 También se divultan en la presente descripción los viriones de los virus adenoasociados recombinantes (rAAV) adaptados para la terapia génica para reducir la neovascularización coroidea que comprenden: (a) una variante de la proteína de la cápside AAV2 que comprende una inserción del péptido de la secuencia de aminoácidos LGETTRP insertado en la posición de los aminoácidos entre el 587 y el 588 en la AAV2, en donde la inserción del péptido confiere un aumento en la infectividad de una célula ocular en relación con un virión AAV que comprende una proteína no variante o no modificada de la cápside AAV2 correspondiente; (b) una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un polipéptido o transgén terapéutico que tiene al menos un 95 % de homología con el afibercept.

30 También se divultan en la presente descripción los métodos de tratamiento de una afección o enfermedad ocular que comprenden la administración de un virión de rAAV adaptado para la terapia génica y el suministro *in vivo* de una secuencia de ácido nucleico para expresar el afibercept, o un fragmento funcional o variante del mismo, como se describe en la presente al ojo de un sujeto humano; donde el sujeto humano ha sido diagnosticado previamente con una afección ocular asociada con la neovascularización. En algunos casos, la terapia génica del afibercept se administra a un paciente que responde al afibercept o que fue pre-tratado con EYLEA® (afibercept).

35 En algunos casos, en la presente descripción se divultan los métodos y formulaciones farmacéuticas que comprenden: (a) un virión de un virus adenoasociado recombinante (rAAV) adaptado para la terapia génica que comprende: (i) una variante de la proteína de la cápside del AAV que comprende una inserción de aminoácidos seleccionada de LGETTRP, NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KD'TDTTR, RAGGSVG, AVDTTKF, y STGKVPN en una posición que corresponde a los aminoácidos 570-611 de la proteína de la cápside VP1 en el AAV2, y donde la variante de la proteína de la cápside confiere un aumento en la infectividad de una célula de la retina (por ejemplo, las células fotorreceptoras o el epitelio pigmentario de la retina) en relación con un virión de AAV que comprende una proteína no variante de la cápside de AAV2 correspondiente; y (ii) una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica el afibercept; y (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, el producto génico que se codifica es una proteína de fusión o un polipéptido que tiene al menos un 95 % de homología con el afibercept. En algunos casos, un excipiente farmacéuticamente aceptable comprende un tensioactivo (por ejemplo, tensioactivo no iónico, plurónico, poloxámero, o polisorbato) que previene la agregación en la composición farmacéutica descrita en la presente descripción.

50 A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica.

55 La terminología usada en la presente descripción tiene el propósito de describir únicamente casos particulares y no pretende ser limitativa. Como se usa en la presente descripción, las formas singulares "un", "una" y "el" pretenden incluir las formas plurales también, a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera. Además, en la medida en que los términos "que incluye", "incluye", "que tiene", "tiene", "con", o las variantes de los mismos se usan en la descripción detallada y/o en las reivindicaciones, dichos términos pretender ser inclusivos 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 no concluyente.

60 Cualquier referencia a "o" en la presente descripción pretende abarcar "y/o" a menos que se indique de cualquier otra manera. 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 los primates, que incluye los primates no humanos tales como los monos, por ejemplo, los monos verdes africanos y los monos rhesus, y los humanos. En los casos preferentes, el sujeto es un humano o un paciente humano.

- 5 Los términos "trata", "tratar", "tratamiento", "mejora" o "mejorar" y otros equivalentes gramaticales como se usan en la presente descripción, incluyen aliviar, reducir o mejorar una enfermedad o los síntomas de la condición, prevenir los síntomas adicionales, mejorar o prevenir las causas metabólicas 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, aliviar una afección causada por la enfermedad o afección, o detener los síntomas de la enfermedad o afección, y se pretende que incluyan la profilaxis. Los términos incluyen además lograr un beneficio terapéutico y/o un beneficio profiláctico. Por beneficio terapéutico se entiende la erradicación o la mejora de la enfermedad subyacente que se está tratando. Además, se logra un beneficio terapéutico con la erradicación o mejora de uno o más de los síntomas fisiológicos asociados con la enfermedad subyacente de tal manera que se observa una mejora en el paciente, a pesar de que, en algunos casos, el paciente todavía sufre la enfermedad subyacente. Para un beneficio profiláctico, las composiciones farmacéuticas se administran a un paciente con el riesgo de desarrollar una enfermedad particular, o a un paciente que reporta uno o más de los síntomas fisiológicos de una enfermedad, incluso si no se ha hecho un diagnóstico de la enfermedad.
- 10
- 15
- 20 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 las composiciones terapéuticas o farmacéuticas al sitio deseado de acción biológica. Estos métodos incluyen la inyección intravítreo o subretiniana en un ojo.
- 25 Los términos "cantidad efectiva", "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad farmacéuticamente efectiva" como se usan en la presente, pueden referirse a una cantidad suficiente de al menos una composición farmacéutica o compuesto que se administra que aliviará en cierta medida uno o más de los síntomas de la enfermedad o afección que se está tratando.
- 30 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, y es relativamente no tóxico (es decir, cuando el material se administra a un individuo no causa efectos biológicos indeseables ni interactúa de manera perjudicial con ninguno de los componentes de la composición en la que está contenido).
- 35 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 se limita a, portadores, estabilizadores, diluyentes, agentes dispersantes, agentes de suspensión, agentes espesantes, excipientes y similares.
- 40 Un "vector de AAV" o "vector de rAAV" como se usa en la presente descripción se refiere a un vector de un virus adenoasociado (AAV) o a un vector recombinante de AAV (rAAV) que comprende una secuencia de polinucleótidos que no es de origen de AAV (es decir, un polinucleótido heterólogo de AAV tal como una secuencia de ácido nucleico que codifica un transgén terapéutico, por ejemplo, el afilibercept), 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 terminales repetidas invertidas (ITR) de AAV. El término vector de rAAV abarca tanto las partículas del vector de rAAV como los plásmidos del vector de rAAV. Un vector de rAAV puede ser monocatenario (ssAAV) o autocomplementario (scAAV).
- 45
- 50 Un "virus de AAV" o "partícula viral de AAV" o "partícula del 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 salvaje) y un vector polinucleotídico de rAAV. Si la partícula comprende un polinucleótido heterólogo (es decir, un polinucleótido distinto de un genoma de AAV de tipo salvaje, tal como un transgén que se administrará a una célula de mamífero), se hace referencia típicamente como una "partícula de vector de rAAV" o simplemente "vector de rAAV". Por lo tanto, la producción de partículas de rAAV incluye necesariamente la producción del vector de rAAV, ya que dicho vector está contenido dentro de una partícula de rAAV.
- 55
- 60 El término "empaquetado" como se usa en la presente descripción puede referirse a una serie de eventos intracelulares que pueden resultar en el ensamblaje y encapsidación de una partícula de rAAV.
- 65 Los genes "rep" y "cap" de AAV se refieren a las secuencias de polinucleótidos que codifican las proteínas de replicación y encapsidación del virus adenoasociado. El rep y el cap de AAV están referidos en la presente descripción como "genes de empaquetamiento" de AAV.
- 70 El término "polipéptido" puede abarcar tanto las proteínas naturales como las no naturales (por ejemplo, una proteína de fusión), péptidos, fragmentos, mutantes, derivados y análogos de las mismas. Un polipéptido puede ser monomérico, dimérico, trimérico o polimérico. Además, un polipéptido puede comprender un número de dominios

diferentes, cada uno de los cuales tiene una o más actividades distintas. Para evitar dudas, un "polipéptido" puede ser de una longitud mayor de dos aminoácidos.

- Como se usa en la presente descripción, "variante polipeptídica" o simplemente "variante" se refiere a un polipéptido cuya secuencia contiene una modificación de los aminoácidos. En algunos casos, la modificación puede ser una inserción, duplicación, delección, 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 salvaje. 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 delecciones, en las que se insertan o eliminan uno o más aminoácidos, respectivamente, en la secuencia de la proteína de referencia, y/o los truncamientos de la secuencia de aminoácidos en uno o ambos extremos amino o carboxi. Una variante puede tener la misma o una actividad biológica diferente en comparación con la proteína de referencia, o la proteína no modificada.
- En algunos casos, una variante puede tener, por ejemplo, al menos aproximadamente 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de homología de secuencia total con su proteína de referencia homóloga. En algunos casos, una variante puede tener al menos aproximadamente un 90 % de homología de secuencia total con la proteína de tipo salvaje. En algunos casos, una variante presenta al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 98 %, al menos aproximadamente un 99 %, al menos aproximadamente un 99,5 % o al menos aproximadamente un 99,9 % de identidad de secuencia total.

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 asociada con toda 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 los aislados de ADN clonados, los análogos de polinucleótidos sintetizados químicamente o los análogos de polinucleótidos que se sintetizan biológicamente por sistemas heterólogos, así como a las proteínas y/o ARNm codificados por dichos ácidos nucleicos. Así, 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.

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

El término "vector de expresión" o "constructo de expresión" o "casete" o "plásmido" o simplemente "vector" puede incluir cualquier tipo de constructo genético, que incluye los vectores de AAV o de rAAV, que contienen un ácido nucleico o polinucleótido que codifica para un producto génico en el que parte o toda la secuencia de codificación del ácido nucleico es capaz de transcribirse y está adaptada para la terapia génica. La transcripción puede 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 los elementos de control unidos operativamente a la región de codificación para facilitar la expresión de la proteína en las células objetivo. La combinación de los elementos de control y un gen o los genes a los que están unidos operativamente para la expresión a veces pueden referirse como un "casete de expresión", un gran número de los cuales son conocidos y están disponibles en la técnica o pueden construirse fácilmente a partir de los componentes que están disponibles en la técnica.

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

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

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

Cuando se inserta la 7m8 en un rAAV2 (también se conoce como AAV2.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7-mer LGETTRP se inserta en el lazo GH de la proteína de la cápside AAV2, por ejemplo, entre las posiciones 587 y 588 de la proteína de la cápside AAV2, VP1. Cuando se inserta la 7m8 en un rAAV1 (también se conoce como AAV1.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7-mer LGETTRP se inserta en el lazo GH de la proteína de la cápside AAV1, por ejemplo, entre los aminoácidos 590 y 591 de la proteína de la cápside AAV1. Cuando se inserta la 7m8

en un rAAV5 (también se conoce como AAV5.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7-mer LGETTRP se inserta en el lazo GH de la proteína de la cápside AAV5, por ejemplo, entre los aminoácidos 575 y 576 de la proteína de la cápside AAV5. Cuando se inserta la 7m8 en un rAAV6 (también se conoce como AAV6.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7-mer LGETTRP se inserta en el lazo GH de la proteína de la cápside AAV6, por ejemplo, entre los aminoácidos 590 y 591 de la proteína de la cápside AAV6. Cuando se inserta la 7m8 en un rAAV7 (también se conoce como AAV7.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7-mer LGETTRP se inserta en el lazo GH de la proteína de la cápside AAV7, por ejemplo, entre los aminoácidos 589 y 590 de la proteína de la cápside AAV7. Cuando se inserta la 7m8 en un rAAV8 (también se conoce como AAV8.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7-mer LGETTRP se inserta en el lazo GH de la proteína de la cápside AAV8, por ejemplo, entre los aminoácidos 590 y 591 de la proteína de la cápside AAV8. Cuando se inserta la 7m8 en un rAAV9 (también se conoce como AAV9.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7-mer LGETTRP se inserta en el lazo GH de la proteína de la cápside AAV9, por ejemplo, entre los aminoácidos 588 y 589 de la proteína de la cápside AAV9. Cuando se inserta la 7m8 en un rAAV10 (también se conoce como AAV10.7m8), la secuencia de aminoácidos de 7-mer LGETTRP se inserta en el lazo GH de la proteína de la cápside AAV10, por ejemplo, entre los aminoácidos 589 y 590 de la proteína de la cápside AAV10.

Los títulos de las secciones que se usan en la presente descripción son para fines organizativos solamente y no deben interpretarse como una limitación del contenido descrito.

20 Vectores

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

En algunos casos, el suministro de la secuencia de ácido nucleico del afibbercept puede realizarse mediante el uso de cualquier "vector" adecuado (también conocido como "suministro de genes" o "vehículo de transferencia de genes"). El vector (por ejemplo, el rAAV), el vehículo de suministro, el vehículo de suministro de genes o el vehículo de transferencia de genes, puede abarcar cualquier macromolécula adecuada o complejo de moléculas que comprenden un polinucleótido que se suministra a una célula objetivo, por ejemplo, las células de la retina, que incluyen un fotorreceptor, una célula ganglionar de la retina, una célula de Müller, una célula bipolar, una célula amacrina, una célula horizontal, o una célula del epitelio pigmentado de la retina. En algunos casos, una célula objetivo puede ser cualquier célula a la que se le suministra la molécula de ácido nucleico o el gen. El polinucleótido que se va a suministrar puede comprender una secuencia de codificación de un transgén terapéutico, tal como el transgén afibbercept.

La composición y los métodos de la divulgación proporcionan cualquier método adecuado para el suministro de una secuencia de ácido nucleico del afibbercept en un ojo o en las células de la retina de un primate no humano o de un sujeto humano. En algunos casos, el suministro de la molécula de ácido nucleico, el polinucleótido o la terapia génica se formula o se adapta para la inyección intravítreo en un ojo de un primate no humano o un sujeto humano.

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

En algunos casos, un vector comprende 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 los polinucleótidos. El ácido nucleico y el polinucleótido pueden usarse indistintamente. En algunos casos, los ácidos nucleicos comprenden el ADN o el ARN. En algunos casos, los ácidos nucleicos incluyen el ADN (por ejemplo, ADNc) o el ARN para la expresión del afibbercept. En algunos casos, el ARN puede incluir un transcripto de un gen de interés (por ejemplo, el afibbercept), intrones, regiones no traducidas (UTR), secuencias de terminación y similares. En otros casos, el ADN puede incluir, pero no se limita a, las secuencias tales como secuencias promotoras, un gen de interés (por ejemplo, el afibbercept), UTR, secuencias de terminación y similares. En algunos casos, puede usarse una combinación de ADN y ARN.

En algunos casos, la presente divulgación describe un virus recombinante, tal como un virus adenoasociado recombinante (rAAV) como un vector para el suministro y la expresión del afibbercept en un sujeto.

En algunos casos, cualquier vector viral adecuado puede diseñarse u optimizarse para su uso con las composiciones y los métodos de la divulgación. Por ejemplo, los vectores virales recombinantes derivados del adenovirus (Ad) o de los virus adenoasociados (AAV) pueden alterarse de manera tal que su replicación sea

- defectuosa en sujetos humanos o primates. En algunos casos, pueden obtenerse sistemas de vectores virales híbridos mediante el uso de métodos conocidos por un experto en la técnica y usados para suministrar un ácido nucleico que codifica el afibbercept a las células de la retina. En algunos casos, un sistema de suministro viral o terapia génica puede integrar una secuencia de ácido nucleico que comprende el gen afibbercept en el genoma de la célula objetivo (por ejemplo, el genoma de las células de la retina) y dar lugar a una expresión génica estable del gen en el tiempo. En algunos casos, el gen afibbercept 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.
- 5
- En algunos casos, un vector viral adecuado para suministrar una secuencia de ácido nucleico del afibbercept a las células de la retina es el AAV o el rAAV, que son pequeños virus de ADN monocatenario sin envoltura. Los rAAV son parvovirus humanos no patogénicos y pueden hacerse dependientes de virus auxiliares, que incluyen los adenovirus, los virus del herpes simple, los virus vaccinia y el CMV, para la replicación. La exposición a los AAV de tipo salvaje (ts) no está asociada ni se conoce que cause ninguna patología humana y es común en la población general, lo que hace al AAV o al rAAV un sistema de suministro adecuado para la terapia génica. El AAV y el rAAV usados para el suministro de un transgén terapéutico en la terapia génica, por ejemplo, el afibbercept, pueden ser de cualquier serotipo. En algunos casos, las composiciones farmacéuticas y los métodos de la divulgación se refieren al uso de cualquier serotipo del AAV adecuado, que incluyen AAV1, AAV2, AAV2.5, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, rh10, AAV-DJ, y cualquier AAV híbrido o químérico de los mismos. En algunos casos, el serotipo usado se basa en el tropismo del virus, o en la infectividad de una célula objetivo de interés. En algunos casos, se usa el AAV2 o el rAAV2 para suministrar una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept en un ojo o en las células de la retina de un sujeto a través de una inyección intravítreo o subretiniana. En algunos casos, el rAAV2.7m8 se usa para suministrar la secuencia de ácido nucleico del afibbercept en las células de la retina de un sujeto.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- En algunos casos, los virus de AAV o rAAV, las partículas o los viriones que comprenden una variante de la proteína de la cápside que tiene una mayor infectividad de las células objetivo, por ejemplo, las células de la retina se usan para aumentar la transducción de las células de la retina o para aumentar la dirección del suministro de los genes a las células de la retina en un sujeto. En algunos casos, el virión del rAAV comprende una modificación de aminoácidos en un lazo GH de la proteína de la cápside/lazo IV de la proteína de la cápside del VAA. En algunos casos, el sitio de modificación es una porción accesible al solvente del lazo GH/lazo IV de la proteína de la cápside del AAV. Para una descripción del lazo GH/lazo IV de la cápside del 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. Se conocen varias variantes de la cápside del AAV, que incluye la variante 7m8. En algunos casos, un virión del rAAV comprende una variante de la proteína de la cápside del AAV que comprende una inserción de 5 aminoácidos a 11 aminoácidos, por ejemplo, una secuencia de 7 aminoácidos, en el lazo GH de una proteína de la cápside en relación con una proteína de la cápside del AAV parental correspondiente, y en donde la variante de la proteína de la cápside confiere un aumento de la infectividad de una célula de la retina en comparación con la infectividad de la célula de la retina por un virión del AAV que comprende la proteína de la cápside del AAV parental o no modificada correspondiente. En algunos casos, cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos puede insertarse en el lazo GH de una proteína de la cápside: LGETTRP (7m8), NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTTR, RAGGSVG, AVDTTKF y STGKVPN. En algunos casos, cualquiera de las secuencias de aminoácidos LGETTRP (7m8), NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTTR, RAGGSVG, AVDTTKF y STGKVPN se inserta en el lazo GH de la proteína de la cápside VP1 expuesto al solvente en un rAAV. En algunos casos, el rAAV.7m8 que comprende el afibbercept se usa para la terapia génica.
- En algunos casos, cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos: NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTTR, RAGGSVG, AVDTTKF y STGKVPN pueden insertarse en las posiciones siguientes para generar una variante del rAAV para su uso en la terapia génica: entre las posiciones 587 y 588 de la proteína de la cápside AAV2; entre los aminoácidos 590 y 591 de la proteína de la cápside AAV1; entre los aminoácidos 575 y 576 de la proteína de la cápside AAV5; entre los aminoácidos 590 y 591 de la proteína de la cápside AAV6; entre los aminoácidos 589 y 590 de la proteína de la cápside AAV7; entre los aminoácidos 590 y 591 de la proteína de la cápside AAV8; entre los aminoácidos 588 y 589 de la proteína de la cápside AAV9; o entre los aminoácidos 589 y 590 de la proteína de la cápside AAV10.
- En algunos casos, el ácido nucleico que codifica un producto génico tal como el afibbercept puede estar bajo control transcripcional por un promotor que inicia la transcripción del gen. En algunos casos, el promotor es un promotor "fuerte" o constitutivamente activo, por ejemplo, un promotor del CMV. En algunos casos, el promotor de la conexina 36 se usa para conducir la expresión de un transgén terapéutico, por ejemplo, el afibbercept. En algunos casos, pueden usarse los promotores específicos de tejido para efectuar la transcripción en los tejidos o células específicos, tales como las células de la retina, para reducir la toxicidad potencial o los efectos indeseables en las células no objetivo. En algunos casos, un virus recombinante y/o un plásmido se usan para generar un virus rAAV que puede comprender otros elementos transcripcionales o reguladores, tales como la secuencia poli A (poliadenilación), las regiones no traducidas (UTR), las UTR 3', o las secuencias de terminación. En algunos casos, puede expresarse más de un gen a partir del vector o del plásmido mediante el uso del sitio de entrada del ribosoma interno (IRES) o los elementos similares que permiten la coexpresión de dos o más proteínas o crean ARNm multigénicos o policistrónicos.

- En algunos casos, el rAAV y/o el plásmido se usan para generar el virus rAAV que 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 el afibbercept; una segunda secuencia UTR; una secuencia poli A; y una segunda secuencia ITR. En algunos casos, se usa una secuencia de unión entre cada uno de estos elementos de ácido nucleico. En algunos casos, la secuencia que codifica el afibbercept comprende una secuencia que codifica la proteína de fusión afibbercept o un fragmento funcional de la misma.
- En algunos casos, el vector viral de la divulgación se mide como genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de los virus recombinantes de esta divulgación comprende entre 1×10^{10} a 2×10^{10} , entre 2×10^{10} a 3×10^{10} , entre 3×10^{10} a 4×10^{10} , entre 4×10^{10} a 5×10^{10} , entre 5×10^{10} a 6×10^{10} , entre 6×10^{10} a 7×10^{10} , entre 7×10^{10} a 8×10^{10} , entre 8×10^{10} a 9×10^{10} , entre 9×10^{10} a 10×10^{10} , entre 1×10^{11} a 2×10^{11} , entre 2×10^{11} a 3×10^{11} , entre 3×10^{11} a 4×10^{11} , entre 4×10^{11} a 5×10^{11} , entre 5×10^{11} a 6×10^{11} , entre 6×10^{11} a 7×10^{11} , entre 7×10^{11} a 8×10^{11} , entre 8×10^{11} a 9×10^{11} , entre 9×10^{11} a 10×10^{11} , entre 1×10^{12} a 2×10^{12} , entre 2×10^{12} a 3×10^{12} , entre 3×10^{12} a 4×10^{12} , entre 4×10^{12} a 5×10^{12} , entre 5×10^{12} a 6×10^{12} , entre 6×10^{12} a 7×10^{12} , entre 7×10^{12} a 8×10^{12} , entre 8×10^{12} a 9×10^{12} , entre 9×10^{12} a 10×10^{12} , 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 9×10^{13} a 10×10^{13} genomas vectoriales. En algunos casos, el rAAV de esta divulgación es aproximadamente 2×10^{12} genomas vectoriales. En algunos casos, el rAAV de la divulgación comprende $2E12$ a $6E12$ genomas vectoriales. En algunos casos, el rAAV de esta divulgación está 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 vectoriales.
- En algunos casos, se selecciona una menor cantidad o intervalo del genoma vectorial para una dosis unitaria para evitar la agregación. En algunos casos, se selecciona una mayor cantidad o intervalo del genoma vectorial para una dosis unitaria de modo que pueda usarse un volumen menor para la inyección. Un volumen menor (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 intravítreo. En algunos casos, una concentración más alta del rAAV también ayuda a asegurar el suministro eficiente del transgén terapéutico en las células objetivo.
- En algunos casos, los virus recombinantes de esta divulgación son 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 abreviatura para la base 10 de la potenciación, y xEy se refiere a x multiplicado por la base 10 a la potencia y/exponente.

En algunos casos, las composiciones farmacéuticas divulgadas 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 vectoriales, en donde E es una abreviatura para la base 10 de la potenciación, y en donde xEy se refiere a x multiplicado por la base 10 a la potencia y/exponente.

En algunos casos, una dosis unitaria comprende entre 2E12 a 6E12 genomas vectoriales. 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 vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria comprende entre 1E12 a 1,5E12, entre 1,5E12 a 2E12, entre 2E12 a 2,5E12, entre 2,5E12 a 3,0E12, entre 3,0E12 a 3,5E12, entre 3,5E12 a 4,0E12, entre 4,0E12 a 4,5E12, entre 4,5E12 a 5,0E12, entre 5,0E12 a 5,5E12, entre 5,5E12 a 6,0E12, entre 6,0E12 a 6,5E12, entre 6,5E12 a 7,0E12, entre 7,0E12 a 7,5E12, entre 7,5E12 a 8,0E12, entre 8,0E12 a 8,5E12, entre 8,5E12 a 9,0E12, entre 9,0E12 a 9,5E12, o entre 9,5E12 a 10E12 genomas vectoriales. 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 vectoriales. 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 vectoriales.

En algunos casos, el vector viral de la divulgación se mide mediante el uso de la multiplicidad de la infección (MDI). En algunos casos, la MDI se refiere a la relación, o al múltiplo del vector o el genoma viral de las células a las que se puede suministrar el ácido nucleico. En algunos casos, la MDI es 1×10^6 . En algunos casos, los virus recombinantes de la divulgación 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} MDI. En algunos casos, los virus recombinantes de esta divulgación pueden ser de 1×10^8 a 1×10^{15} MDI. En algunos casos, los virus recombinantes de la divulgación 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} MDI.

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 y los métodos farmacéuticos de esta divulgación. 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 AAV autocomplementarios puede evitar el requerimiento de la síntesis de ADN de la segunda hebra viral y puede conducir a una mayor relación de la expresión de la proteína transgénica, como lo proporciona Wu, Hum Gene Ther. 2007, 18(2):171-82.

En algunos aspectos, pueden generarse varios vectores AAV para permitir la selección del serotipo y el promotor más óptimo para su uso con el transgén afibbercept.

En algunos casos, el vector puede ser un vector dirigido, especialmente un rAAV dirigido (por ejemplo, el AAV2.7m8) que muestra una mayor infectividad de una célula específica, tal como las células de la retina, o un fotorreceptor, una célula ganglionar de la retina, una célula de Müller, una célula bipolar, una célula amacrina, una célula horizontal, o una célula del epitelio pigmentado de la retina. Los vectores virales para usar en la divulgación pueden incluir aquellos que exhiben baja toxicidad y/o baja inmunogenicidad en un sujeto y expresan cantidades

terapéuticamente efectivas de la proteína afibbercept en un sujeto, por ejemplo, un paciente humano.

En la presente descripción se divultan las composiciones farmacéuticas y los métodos para administrar un ácido nucleico que codifica el afibbercept 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 el rAAV2.7m8, y una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept en un primate no humano o en un sujeto humano. En algunos casos, el suministro del afibbercept a través de la terapia génica puede usarse para mejorar al menos parcialmente o prevenir una enfermedad o afección ocular descrita en la presente descripción.

- 10 En algunos casos, el aumento en la infectividad de las células de la retina de la variante rAAV (por ejemplo, la variante 7m8) es 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 del AAV parental o no modificada correspondiente. En algunos casos, el aumento en la infectividad de las células de la retina es un aumento de entre el 5 % al 100 %, entre el 5 % al 95 %, entre el 5 % al 90 %, entre el 5 % al 85 %, entre el 5 % al 80 %, entre el 5 % al 75 %, entre el 5 % al 70 %, entre el 5 % al 65 %, entre el 5 % al 60 %, entre el 5 % al 55 %, entre el 5 % al 50 %, entre el 5 % al 45 %, entre el 5 % al 40 %, entre el 5 % al 35 %, entre el 5 % al 30 %, entre el 5 % al 25 %, entre el 5 % al 20 %, entre el 5 % al 15 %, entre el 5 % al 10 % en comparación con un virión de AAV que comprende la proteína de la cápside de AAV parental o no modificada correspondiente.
- 15 20 En algunos casos, el aumento en la infectividad de las células de la retina 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 parental o no modificada correspondiente. En algunos casos, el aumento en 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 parental correspondiente. En algunos casos, el aumento en 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 del AAV parental o no modificada correspondiente.
- 25 30 En algunos casos, el aumento en la infectividad de las células de la retina es 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 del AAV parental o no modificada correspondiente.
- 35 40 En algunos casos, el aumento en la infectividad de las células de la retina es 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 del AAV parental o no modificada correspondiente.
- 45 50 En algunos casos, una modificación de los aminoácidos de una proteína de la cápside descrita en la presente descripción puede conferir un aumento en la capacidad de cruzar una membrana limitante interna (MLI) en un ojo de un primate o sujeto humano en comparación con la capacidad de un virión AAV que comprende la proteína de la cápside del AAV parental o no modificada correspondiente para cruzar la MLI en el ojo del sujeto. En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la MLI es un aumento 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 del AAV parental o no modificada correspondiente. En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la MLI es un aumento de entre el 5 % al 100 %, entre el 5 % al 95 %, entre el 5 % al 90 %, entre el 5 % al 85 %, entre el 5 % al 80 %, entre el 5 % al 75 %, entre el 5 % al 70 %, entre el 5 % al 65 %, entre el 5 % al 60 %, entre el 5 % al 55 %, entre el 5 % al 50 %, entre el 5 % al 45 %, entre el 5 % al 40 %, entre el 5 % al 35 %, entre el 5 % al 30 %, entre el 5 % al 25 %, entre el 5 % al 20 %, entre el 5 % al 15 %, o entre el 5 % al 10 % en comparación con la proteína de la cápside del AAV parental o no modificada.
- 55 60 65 En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la MLI es de 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 del AAV parental correspondiente. En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la MLI es de 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 del AAV parental correspondiente. En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la MLI es de 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 del AAV parental o no modificada correspondiente.

En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la MLI es 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 del AAV parental o no modificada correspondiente.

En algunos casos, el aumento en la capacidad de cruzar la MLI es 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 del AAV parental o no modificada correspondiente.

20 Aflibercept

En algunos casos, una terapia génica se usa para suministrar un transgén terapéutico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica o expresa el aflibercept cuando se administra a un ojo o al vítreo de un ojo de un primate no humano o a un sujeto humano. En algunos casos, el rAAV que comprende una variante de la cápside (por ejemplo, el AAV2.7m8) descrito en la presente descripción comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica el aflibercept y se usa para suministrar la secuencia del gen aflibercept en las células de la retina tras la inyección intravítreo o subretiniana a un sujeto. En algunos casos, el rAAV que comprende el gen aflibercept se formula para la terapia génica y la inyección intravítreo. En algunos casos, el gen aflibercept se refiere a un fragmento funcional o una variante del mismo. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico del aflibercept se deriva de su secuencia de aminoácidos. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico del aflibercept es un codón optimizado para mejorar su expresión en un sujeto.

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 mejorar la expresión de un gen en las células objetivo o huésped de interés, por ejemplo, las células de la retina humana, 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 más frecuencia o que se usan con más frecuencia en la célula huésped mientras se mantiene la secuencia de aminoácidos nativa. Las tablas de uso de codones están disponibles, que incluyen, por ejemplo, la herramienta de tabla de frecuencia de uso de codones GenScript en <http://www.genscript.com/tools/codon-frequency-table>; 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).

El aflibercept es una proteína de fusión de 115 kDa, que puede glucosilarse. El aflibercept comprende una estructura de IgG fusionada con las secuencias extracelulares del receptor de VEGF del VEGFR-1 y VEGFR-2 humanos, y funciona como un receptor anzuelo soluble al unirse al VEGF-A con una mayor afinidad que a sus receptores naturales o endógenos. Ver, por ejemplo, Stewart MW. Aflibercept (VEGF Trap-eye): the newest anti-VEGF drug. Br. J. Ophthalmol. Septiembre 2012;96(9):1157-8. La alta afinidad del aflibercept por el VEGF interfiere o interrumpe la unión y activación subsecuente de los receptores de VEGF nativos o endógenos. La actividad reducida del VEGF puede conducir a una disminución de la angiogénesis y la permeabilidad vascular. La inhibición del factor de crecimiento placentario PIGF y el VEGF-B por el aflibercept también puede contribuir al tratamiento de afecciones angiogénicas. El PIGF se ha asociado con la angiogénesis y puede estar elevado en múltiples afecciones, como la DMRE húmeda. La sobreexpresión del VEGF-B puede asociarse con la ruptura de la barrera hematorretiniana y la angiogénesis de la retina. Por lo tanto, la inhibición del VEGF-A, el VEGF-B y el PIGF pueden contribuir a la eficacia del aflibercept.

El producto génico descrito en la presente descripción consta del aflibercept, un fragmento funcional, o un mutante o variante del mismo. La secuencia de aminoácidos del aflibercept es conocida en la técnica: C₄₃₁₈H₆₇₈₈N₁₁₆₄O₁₃₀₄S₃₂, el Identificador de Ingrediente Único de la FDA (UNII) es 15C2VL427D. La secuencia de aminoácidos del aflibercept está disponible en DrugBank, número de acceso DB08885:

SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCE
ATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKT
QSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCASSGLMTKKNSTVRVHEKDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKC

KVSNKALPAPIEKTIKAKGQQREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV
LSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 1).

5 La secuencia de ácido nucleico del afibercept (SEQ ID NO: 2) se ilustra en la **Figura 5**. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico del afibercept es un codón optimizado para la expresión en un primate o un sujeto humano. La construcción de un gen sintético correspondiente a la secuencia de aminoácidos del afibercept se ha descrito en la literatura, por ejemplo, Kanda A, Noda K, Saito W, Ishida S. Afibercept Traps Galectin-1, an Angiogenic Factor Associated with Diabetic Retinopathy. Scientific Reports 5:17946 (2015) (que describe "Se generó ADNc del VEGF-Trap_{R1R2} (correspondiente al afibercept) como un gen sintético por IDT (Coralville, IA)"). Dada la 10 secuencia de aminoácidos disponible del afibercept, puede usarse cualquier método conocido en la técnica para generar el ADNc del afibercept para su uso en una terapia génica o un rAAV descrito en la presente descripción.

15 La homología se refiere al % de conservación de los residuos de un alineamiento entre dos secuencias, que incluye, pero no se limita a, los fragmentos funcionales, las secuencias que comprenden inserciones, las delecciones, las sustituciones, los pseudofragmentos, los pseudogenes, las variantes de empalme o las secuencias optimizadas artificialmente.

20 En algunos casos, el producto génico afibercept, o el transgén afibercept, como se incluye en una terapia génica a base de un rAAV comprende una variante de la cápside como se describe en la presente descripción (por ejemplo, la variante 7m8), que codifica una proteína, proteína de fusión, o polipéptido que tiene al menos un 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %, o al menos 100 % de homología con la secuencia de aminoácidos anterior de SEQ ID NO: 1, o entre las correspondientes secuencias de ADNc del afibercept (por ejemplo, el ADNc de la secuencia del afibercept que se usa en una terapia génica en comparación con la SEQ ID NO: 2). En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción 25 comprenden un fragmento funcional del afibercept, o una variante o mutante del mismo. En algunos casos, la secuencia de ácido nucleico del afibercept se modifica o se optimizan los codones para mejorar su actividad, expresión, estabilidad, y/o solubilidad in vivo.

30 En algunos casos, el AAV2.7m8 se usa como una terapia génica o un sistema de suministro del afibercept. El AAV2.7m8-afibercept se refiere a un rAAV2 que comprende la inserción de 7m8 entre las posiciones 587 y 588 en la proteína de la cápside VP1 del rAAV2 y una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibercept.

Composiciones farmacéuticas

35 En algunos casos, una composición farmacéutica es una formulación que contiene uno o más ingredientes activos, por ejemplo, el AAV2.7m8 que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión afibercept, o un fragmento o variante del mismo, así como uno o más excipientes, portadores, estabilizadores o agentes de carga, que son adecuados para la administración a un paciente humano a través de inyección intravítreo o subretiniana para lograr un efecto terapéutico o profiláctico deseado.

40 En algunos casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden el rAAV o el AAV2.7m8, y una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión afibercept, o un fragmento o variante del mismo, se suministran como una solución homogénea reconstituida. En algunos casos, la solución puede ser una suspensión. En algunos casos, la solución es isotónica. En otros casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden el rAAV o el 45 AAV2.7m8 y una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión afibercept, o un fragmento o variante del mismo, 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 el rAAV (por ejemplo, el AAV2.7m8) y una secuencia de ácido nucleico que codifica la 50 proteína de fusión afibercept, o un fragmento funcional o variante del mismo en una solución reguladora. En algunos casos, dicha composición farmacéutica liofilizada puede comprender además un crioprotector, un tensioactivo, una sal, un estabilizador, o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, se suministra una solución homogénea que contiene la composición farmacéutica como una jeringa precargada.

55 En algunos casos, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción se suministran como una suspensión. En algunos casos, una suspensión es una solución. En algunos casos, la suspensión se refrigerá. 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 a temperatura ambiente y/o agitar la suspensión para asegurar una distribución uniforme antes de la administración o inyección intravítreo a un paciente. En algunos 60 casos, la suspensión se diluye antes de la administración 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, se suministra una suspensión que contiene la composición farmacéutica como una jeringa precargada.

65 En algunos casos, la terapia génica o las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción se proporcionan como una suspensión o una suspensión refrigerada. En algunos casos, la suspensión comprende un

- 5 excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, tensioactivo, glicerol, tensioactivo no iónico, solución reguladora, glicol, sal, y cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, se usan el ácido clorhídrico y el hidróxido de sodio para ajustar el pH de la solución. En algunos casos, la suspensión refrigerada tiene un pH neutro, o un pH entre 6,5 y 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 es ligeramente ácido (por ejemplo, pH de aproximadamente 6,5, 6,3, 6,1, 6, 5,5 o 5). En algunos casos, la suspensión es una solución. En algunos casos, la suspensión comprende micelas. En algunos casos, la suspensión se agita y/o se calienta a temperatura ambiente antes de la administración.
- 10 10 En algunos casos, una terapia génica que comprende una composición farmacéutica que comprende el rAAV (por ejemplo, el AAV2.7m8) y la secuencia de ácido nucleico del afibbercept se suministra como un estuche, que comprende una composición farmacéutica liofilizada o secada por congelación (por ejemplo, una dosis unitaria en un frasco) descrita en la presente descripción y una solución para disolver, diluir, y/o reconstituir la composición farmacéutica liofilizada. En algunos casos, la solución para reconstituir o diluir puede suministrarse como una jeringa precargada. En algunos casos, un estuche comprende una composición farmacéutica liofilizada o secada por congelación que comprende el rAAV (por ejemplo, el AAV2.7m8) y una solución para reconstituir la composición farmacéutica a una concentración o volumen deseados. En algunos casos, el estuche incluye una solución reguladora que ayuda a prevenir la agregación al reconstituir la composición farmacéutica descrita en la presente descripción. En algunos casos, la composición farmacéutica se proporciona en una jeringa precargada. En algunos casos, un estuche comprende una jeringa o recipiente de doble cámara en donde una de las cámaras contiene una solución reguladora para disolver o diluir la composición farmacéutica. En algunos casos, el estuche comprende una jeringa para inyección. En algunos casos, la solución reconstituida se filtra antes de la administración. En algunos casos, el estuche comprende un filtro o una jeringa de filtro para filtrar la composición farmacéutica reconstituida antes de la administración a un paciente.
- 15 20 25 En algunos casos, para la estabilidad durante el almacenamiento y la conveniencia de la manipulación, una composición farmacéutica, que comprende el rAAV (por ejemplo, el AAV2.7m8) y una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión afibbercept, puede formularse como liofilizada, secada por congelación, o polvo seco al vacío, que puede reconstituirse con solución salina, solución reguladora, o agua antes de la administración a un sujeto. Alternativamente, la composición farmacéutica puede formularse como una solución acuosa, tal como una suspensión o una solución homogénea. Una composición farmacéutica puede contener viriones de rAAV o partículas que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept. En algunos casos, puede usarse un virus o un sistema de suministro diferente, por ejemplo, nanopartículas o complejos a base de lípidos, para suministrar la secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept. Para estabilizar una composición farmacéutica pueden usarse diversos excipientes, tales como fosfato, PBS o solución reguladora Tris, glicol, glicerol, solución salina, tensioactivo (por ejemplo, plurónico o polisorbato), o cualquier combinación de los mismos. Adicionalmente, los crioprotectores, como los alcoholes pueden usarse como estabilizantes en las condiciones de congelación o secado de la liofilización. En algunos casos, la terapia génica se proporciona como suspensión o una suspensión refrigerada.
- 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 µL. En algunos casos, la suspensión de la composición farmacéutica que comprende la terapia génica del afibbercept como se describe en la presente descripción tiene un volumen entre 0,1 a 0,5 mL, entre 0,1 a 0,2 mL, entre 0,3 a 0,5 mL, entre 0,5 a 1,0 mL, entre 0,5 a 0,7 mL, entre 0,6 a 0,8 mL, entre 0,8 a 1 mL, entre 0,9 a 1,1 mL, entre 1,0 a 1,2 mL, o entre 1,0 a 1,5 mL. En otros casos, el volumen no es más de 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.
- 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190, o 200 µL. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica comprende un volumen de no más de 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 µL. En algunos casos, los métodos de tratamiento descritos en la presente descripción comprenden la inyección intravítreo 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 µL de una solución que comprende un rAAV (por ejemplo, el AAV2.7m8) y una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept.
- 65 65 En algunos casos, un virión AAV2.7m8 que comprende una secuencia de ácido nucleico del transgén del afibbercept descrito en la presente descripción puede ser un componente de una composición farmacéutica de la terapia génica.

En algunos casos, puede usarse un virión rAAV de cualquier serotipo que comprenda la variante de la proteína de la cápside 7m8 como se describe en la presente descripción para preparar una composición farmacéutica liofilizada o secada por congelación o una suspensión de la misma. En algunos casos, la terapia génica se formula como una suspensión refrigerada. En algunos casos, el virión rAAV es el rAAV2. En algunos casos, la composición

- 5 farmacéutica liofilizada o en suspensión comprende el rAAV2 que tiene la variante de la proteína de la cápside 7m8 y una secuencia de ADN que codifica el afiblerecept, un fragmento funcional, o una variante del mismo. En algunos casos, la suspensión se refrigerará.

En algunos casos, una composición farmacéutica descrita en la presente descripción está adaptada para la terapia génica o para el suministro intravítreo del afibercept como un agente terapéutico en pacientes humanos o primates no humanos. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica comprende entre 1×10^{10} a 1×10^{13} genomas virales (gv). En algunos casos, una dosis unitaria comprende aproximadamente 2.1×10^{11} , aproximadamente 2.1×10^{12} o aproximadamente 2.1×10^{13} genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria

- 15 aproximadamente $2,1 \times 10^{11}$, o aproximadamente $2,1 \times 10^{10}$ genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación es de 1×10^{10} a 3×10^{12} genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación es de 1×10^9 a 3×10^{13} genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación es de 1×10^{10} a 1×10^{11} genomas.

en algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación es de 1×10^6 a 1×10^{10} genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación es de 1×10^8 a 3×10^{14} genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación es de 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 vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición

- farmacéutica de la divulgación es de 1×10^{10} a 5×10^{13} genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación es de 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 vectoriales.

En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación puede medirse como ufp (unidades formadoras de placa). En algunos casos, la ufp de la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación puede ser de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{12} ufp. En algunos casos, la ufp de la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación puede ser de al menos aproximadamente 1×10^8 , $2 \cdot 10^8$, $3 \cdot 10^8$, $4 \cdot 10^8$, $5 \cdot 10^8$, $6 \cdot 10^8$, $7 \cdot 10^8$, $8 \cdot 10^8$, $9 \cdot 10^8$, $1 \cdot 10^9$, $2 \cdot 10^9$, $3 \cdot 10^9$, $4 \cdot 10^9$, $5 \cdot 10^9$, $6 \cdot 10^9$, $7 \cdot 10^9$, $8 \cdot 10^9$, $9 \cdot 10^9$.

- 30 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^9 , 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} upf. En algunos casos, la upf de la dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación puede 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} upf.

En algunos casos, el vector viral de la divulgación puede medirse como genomas vectoriales (gv). En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación puede ser de 1×10^{10} a 1×10^{13} genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación puede ser de

- 40 1×10^9 a 1×10^{14} genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación puede ser de 1×10^{10} a 1×10^{11} genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación puede ser de 1×10^8 a 1×10^{15} genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación es de 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} .

1×10^5 , 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 vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación es de 1×10^8 a 1×10^{15} genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación 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 vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria está entre 10^{10} y 10^{11} , entre 10^{11} y 10^{12} , entre 10^{10} y 10^{12} , entre 10^{12} y 10^{13} , entre 10^{11} y 10^{13} , entre 10^{12} y 10^{13} , entre 10^{12} a 10^{14} , entre 10^{11} a 10^{14} , entre 10^{11} a 10^{15} , entre 10^{12} a 10^{15} , entre 10^{13} a 10^{14} , entre 10^{14} a 10^{15} , entre 10^{15} a 10^{16} , entre 10^{16} a 10^{17} , entre 10^{17} a 10^{18} , entre 10^{18} a 10^{19} , o entre 10^{19} a 10^{20} genomas vectoriales.

- En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación está entre 1×10^{10} a 2×10^{10} , entre 2×10^{10} a 3×10^{10} , entre 3×10^{10} a 4×10^{10} , entre 4×10^{10} a 5×10^{10} , entre 5×10^{10} a 6×10^{10} , entre 6×10^{10} a 7×10^{10} , entre 7×10^{10} a 8×10^{10} , entre 8×10^{10} a 9×10^{10} , entre 9×10^{10} a 10×10^{10} , entre 1×10^{11} a 2×10^{11} , entre 2×10^{11} a 3×10^{11} , entre 2×10^{11} a 2.5×10^{11} , entre 2.5×10^{11} a 3×10^{11} , entre 3×10^{11} a 4×10^{11} , entre 4×10^{11} a 5×10^{11} , entre 5×10^{11} a 6×10^{11} ,

entre 2×10^{12} a 3×10^{12} , entre $2,5 \times 10^{12}$ a 3×10^{12} , entre 3×10^{12} a 4×10^{12} , entre 4×10^{12} a 5×10^{12} , entre 5×10^{12} a 6×10^{12} , entre 6×10^{12} a 7×10^{12} , entre 7×10^{12} a 8×10^{12} , entre 8×10^{12} a 9×10^{12} , entre 9×10^{12} a 10×10^{12} , 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 9×10^{13} a 10×10^{13} genomas vectoriales.

- En algunos casos, una dosis unitaria del rAAV de esta divulgación está 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 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 vectoriales.
- En algunos casos, se usa una concentración más baja para una dosis unitaria (por ejemplo, genomas vectoriales) para prevenir la agregación, que puede ocurrir a concentraciones más altas. En algunos casos, se selecciona una concentración más alta para una dosis unitaria, por ejemplo, genomas vectoriales más altos, para aumentar la eficacia de la terapia génica, o para maximizar el suministro del transgén afibbercept en una inyección o en una administración única de la terapia génica. En algunos casos, las 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 intravítreo, por ejemplo, la presión intraocular elevada, la inflamación, la irritación o el dolor.
- En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica de la divulgación puede medirse mediante el uso de la multiplicidad de infección (MDI). En algunos casos, la MDI puede referirse a la relación, o al múltiplo de los genomas vectoriales o virales de las células a las que puede suministrarse el nucleico. En algunos casos, la MDI puede ser 1×10^6 . En algunos casos, la MDI puede estar entre aproximadamente 1×10^5 y aproximadamente 1×10^7 .
- En algunos casos, la MDI puede ser 1×10^4 - 1×10^8 . En algunos casos, los virus recombinantes de la divulgación pueden ser al menos 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} MDI. En algunos casos, los virus recombinantes de la presente divulgación pueden ser de aproximadamente 1×10^8 a aproximadamente 1×10^{15} MDI. En algunos casos, los virus recombinantes de la divulgación pueden ser 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} MDI. En algunos casos, la MDI está 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 5×10^{12} , entre 5×10^{12} a 10×10^{12} , 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 4×10^{13} , entre 1×10^{13} a 3×10^{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} .
- 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 intravítreo, los portadores adecuados incluyen la solución salina fisiológica, el agua bacteriostática, la solución reguladora salina fosfato (PBS), y/o un agente isotónico, por ejemplo, el glicerol. En todos los casos, la composición farmacéutica debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista la posibilidad de ser inyectada fácilmente. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de los microorganismos como las bacterias y los hongos. En algunos casos, la composición farmacéutica puede incluir un agente isotónico, como una sal o el glicerol. En algunos casos, se agrega un tensioactivo o un estabilizador a la composición farmacéutica para evitar la agregación.
- En algunos casos, el excipiente puede ser un portador. Un portador puede ser un solvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, solución salina, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propileneglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y cualquier combinación de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento como la lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos como los polisorbatos (por ejemplo, Tween™, polisorbato 20, polisorbato 80), dodecilsulfato de sodio (lauryl sulfato de sodio), óxido de lauril dimetilamina, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), alcoholes polietoxilados, polioxietilen sorbitán, octoxinol (Triton X100™), N,N-dimetildodecilamina-N-óxido, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB), polioxil 10 lauril éter, 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 los microorganismos puede lograrse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, cresol, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones internas puede lograrse al incluir en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, el monoestearato de aluminio y la 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 el polisorbato, el poloxámero, o el plurónico. En algunos casos, la adición de un tensioactivo no iónico reduce la agregación en la composición farmacéutica.

- 5 En algunos casos, las composiciones farmacéuticas útiles para la presente divulgación pueden empaquetarse en un estuche para facilitar la aplicación de la presente divulgación. En algunos aspectos, el presente método proporciona un estuche que comprende un nucleico recombinante (por ejemplo, el rAAV o el rAAV2.7m8 que comprende la secuencia de ácido nucleico del afibercept) de la divulgación. En algunos aspectos, el presente método proporciona un estuche que comprende una forma liofilizada de un virus recombinante de la divulgación y una solución para reconstituir el virus antes de la administración a un paciente. En algunos casos, un estuche comprende: un virus recombinante como se describe en la presente descripción, y las instrucciones para administrar a un ojo o a las células de la retina de un sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva del virus recombinante. En algunos aspectos, el estuche comprende sales o soluciones farmacéuticamente aceptables para administrar el virus recombinante. Opcionalmente, el estuche puede comprender además las instrucciones sobre los parámetros operacionales adecuados en forma de una etiqueta o un inserto separado. Por ejemplo, el estuche puede tener instrucciones estándar que informen a un médico o técnico de laboratorio para preparar una dosis unitaria del virus recombinante y/o para reconstituir las composiciones liofilizadas. En algunos casos, opcionalmente, el estuche 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.
 - 10
 - 15
 - 20
 - 25
 - 30
 - 35
 - 40
 - 45
 - 50
 - 55
 - 60
 - 65
- En algunos casos, la composición farmacéutica se proporciona como una suspensión o una suspensión refrigerada. En algunos casos, la suspensión o la suspensión refrigerada se proporciona en un estuche, que puede incluir una jeringa o una solución reguladora para la dilución. En algunos casos, la suspensión o la suspensión refrigerada se proporciona como una jeringa precargada.
- En algunos casos, puede usarse cualquier método adecuado en la purificación bioquímica de los virus recombinantes (por ejemplo, el 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 la liofilización o antes de la formulación como una suspensión.

Indicaciones

- En algunos casos, el virión del rAAV de cualquier serotipo que comprende la variante 7m8 (por ejemplo, el RAAV2.7m8) o una composición farmacéutica del mismo, como se describe en la presente descripción, puede mejorar al menos parcialmente, una enfermedad o afeción ocular asociada con la neovascularización del ojo, o asociada con la NVC. En algunos casos, un virión del rAAV que comprende una variante de la proteína de la cápside se usa para suministrar el afibercept, un fragmento funcional o variante del mismo, en el ojo de un sujeto humano.
- Las indicaciones aprobadas para la proteína de fusión afibercept incluyen la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) neovascular (húmeda), el edema macular después de la oclusión de la vena retiniana (OVR), el edema macular diabético (EMD) y la retinopatía diabética (RD) en pacientes con EMD. En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción pueden usarse para prevenir o tratar una afeción o enfermedad ocular para la que el afibercept está aprobado o indicado. En algunos casos, una terapia génica (por ejemplo, la terapia génica basada en el AAV2.7m8) se usa para tratar o prevenir una afeción o enfermedad ocular que responde al afibercept, que incluye, entre otros, la NVC, la DMRE húmeda, la DMRE seca, el EMD, la OVR, el edema macular después de la OVR y la retinopatía diabética en pacientes con EMD. En algunos casos, una terapia génica de rAAV se usa para tratar o prevenir cualquier afeción o trastorno ocular caracterizado por la neovascularización o la NVC. En otro aspecto, la presente divulgación describe las composiciones farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades tales como la DMRE, el EMD, la OVR, enfermedades relacionadas con la angiogénesis, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedades de organismos infecciosos, y similares.
- En algunos casos, la afeción ocular puede ser el edema macular diabético (EMD) es una inflamación de la retina en la diabetes mellitus debido a la fuga de fluido 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 borrosidad en el medio o justo al lado del campo visual central. La pérdida de visión por el edema macular diabético puede progresar durante un período de meses y hacer que sea imposible enfocar con claridad. Los síntomas comunes del EMD son visión borrosa, moscas volantes, visión doble, y eventualmente la 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 EMD.
- En algunos casos, la afeción ocular puede ser una oclusión de la vena retiniana. La oclusión de la vena retiniana es un bloqueo de las pequeñas venas que transportan la sangre fuera de la retina. La retina es la capa del 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 causada 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 a menudo ocurre en lugares donde las arterias retinianas que se han engrosado o endurecido por la aterosclerosis se cruzan y ejercen presión sobre una vena de la retina. Los síntomas de la oclusión de la vena retiniana pueden incluir una visión borrosa repentina o pérdida de la visión en toda o parte de un ojo. En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas que se describen en la presente descripción se usan para tratar la oclusión de la vena retiniana.
- 5 En algunos casos, la afección ocular puede ser la neovascularización coroidea (NVC), también conocida como DMRE 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, que puede ser una causa importante de la pérdida visual. La NVC puede crear un deterioro repentino de la visión central, perceptible en unas pocas semanas. Otros síntomas pueden incluir las alteraciones del color, y la 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 NVC. La NVC 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.
- 10 La forma "húmeda" avanzada (neovascular o exudativa) de la DMRE es menos común, pero puede causar frecuentemente una pérdida rápida y a menudo sustancial de la visión central en los pacientes. En la forma húmeda de la DMRE, la neovascularización coroidea se forma y se desarrolla en una red de vasos que pueden crecer debajo y a través del epitelio del pigmento de la retina. Como esto se acompaña de una fuga de plasma y/o hemorragia en el espacio subretiniano, podría haber una grave pérdida repentina de la visión central si esto ocurre en la mácula. El término "DMRE", si no se especifica de cualquier otra manera, puede ser la DMRE seca o la DMRE húmeda. La presente divulgación contempla el tratamiento o la prevención de la DMRE, la DMRE húmeda y/o la DMRE seca. En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas como se describen en la presente descripción se usan para tratar la DMRE.
- 15 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 al afibbercept in vivo.
- 20 En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción, es decir, la terapia génica de AAV que comprende el afibbercept, un fragmento funcional o una variante del mismo, resulta en una reducción de la neovascularización o la NVC, medida por el porcentaje de lesiones de grado IV después de la formación de la NVC de acuerdo con la fotografía a color del fondo de ojo, en 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 %, 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 el 95 %, o al menos el 100 % en comparación con un vehículo o una solución reguladora control.
- 25 En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción, es decir, la terapia génica de AAV que comprende el afibbercept, un fragmento funcional o una variante del mismo, resulta en una reducción en la neovascularización o la NVC, medida por el porcentaje de lesiones de grado IV después de la formación de la NVC de acuerdo con la fotografía a color del fondo de ojo, que es comparable al afibbercept o a un afibbercept no basado en la terapia genética. En algunos casos, la reducción en la NVC, o el efecto terapéutico, dura más con la administración de una terapia génica que comprende el afibbercept en comparación con la administración con un afibbercept no basado en la terapia genética o una solución proteica del afibbercept. En algunos casos, el efecto terapéutico de la terapia génica con afibbercept dura al menos 1 año, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años después de una única inyección intravítreo. En algunos casos, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción inhiben o secuestran el VEGF y/o el PIGF endógenos.
- 30 Métodos de uso
- 35 En algunos casos, la presente divulgación describe un método para el tratamiento de una enfermedad ocular patológica relacionada con la angiogénesis, que comprende administrar una cantidad farmacéuticamente efectiva de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción a un sujeto humano que necesite dicho tratamiento. En algunos casos, la enfermedad se selecciona del grupo de enfermedades neovasculares oculares que incluyen la degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), la DMRE húmeda, la DMRE seca, la neovascularización de la retina, la neovascularización coroidea, la retinopatía diabética, la retinopatía diabética proliferativa, la oclusión de la vena retiniana, la oclusión de la vena retiniana central, la oclusión de la vena retiniana ramificada, el edema macular diabético, la isquemia retiniana diabética, la retinopatía isquémica y el edema retiniano diabético, y cualquier combinación de los mismos.

- En algunos casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden un rAAV que comprende una variante de la proteína de la cápside (por ejemplo, el rAAV.7m8) y una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept se usan para tratar o prevenir la DMRE, que incluye la DMRE seca y la DMRE húmeda. En algunos casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden un rAAV que comprende una variante de la proteína de la cápside (por ejemplo, el rAAV.7m8) y una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept se usan para tratar o prevenir la NVC, o reducir las lesiones de la NVC 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, el RAAV.7m8) y una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept se usan para tratar o prevenir cualquiera de la DMRE, la DMRE húmeda, la DMRE seca, la neovascularización de la retina, la neovascularización coroidea, la retinopatía diabética, la retinopatía diabética proliferativa, la oclusión de la vena retiniana, la oclusión de la vena retiniana central, la oclusión de la vena retiniana ramificada, la OVR, el edema macular diabético, la isquemia retiniana diabética, la retinopatía isquémica y el edema retiniano diabético, la RD en pacientes con EMD, y cualquier combinación de los mismos.
- En algunos casos, el método de tratamiento de la DMRE, el EMD, la OVR o la RD comprende tratar previamente a un paciente con EYLEA® antes de la administración de una terapia génica que comprende una secuencia de ácido nucleico del afibbercept al mismo paciente. En algunos casos, un paciente se trata previamente con EYLEA® antes de recibir una dosis única de la terapia génica de afibbercept, como se describe en la presente descripción. En algunos casos, un paciente responde al afibbercept antes de recibir una dosis única de la terapia génica de afibbercept, como se describe en la presente descripción. En algunos casos, un paciente que responde al afibbercept o que se trató previamente con el afibbercept se trata con la terapia génica de afibbercept, como se describe en la presente descripción, seguido 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 ni EYLEA® ni terapia génica de afibbercept. En algunos casos, después de que un paciente recibe una inyección intravítreas de la terapia génica de afibbercept, el paciente no comienza a recibir EYLEA® u otra inyección estándar de cuidado, u otra terapia aprobada (por ejemplo, ranibizumab o inyección de bevacizumab) hasta al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años después del tratamiento de la terapia génica. En algunos casos, un método de tratamiento comprende valorar o evaluar a los pacientes para la capacidad de respuesta al afibbercept (por ejemplo, por un inmunoensayo o una prueba de sangre) antes de administrar la terapia génica de afibbercept al paciente.
- En algunos casos, la terapia génica de afibbercept descrita 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 afibbercept descrita en la presente descripción, el paciente no necesita usar ninguna otra terapia basada en afibbercept.
- En algunos casos, los pacientes que experimentan efectos adversos asociados con inyecciones intravítreas repetidas de EYLEA® u otra terapia aprobada, por ejemplo, inflamación, presión intraocular elevada, o infección bacteriana, pueden ser candidatos para el tratamiento con la terapia génica de afibbercept descrita en la presente descripción. En algunos casos, estos riesgos son menores en la terapia génica porque solo requiere una inyección en la vida del paciente o no se administra más de una vez en al menos 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50 o más años. En algunos casos, el tratamiento con la terapia génica de afibbercept que se describe en la presente descripción, puede ser más rentable que las inyecciones a base de proteínas porque los efectos terapéuticos de una terapia génica pueden durar más, y el costo de una inyección de la terapia génica única puede ser menor que el costo de las inyecciones combinadas de múltiples inyecciones repetidas de una proteína.
- Además, al no requerir inyecciones repetidas, la terapia génica aborda el desafío del cumplimiento y la adherencia del paciente asociado con las terapias que requieren inyecciones repetidas, ya que el no-cumplimiento (por ejemplo, cuando un paciente olvida u omite una o más inyecciones programadas) puede resultar en pérdida de la visión y deterioro de la enfermedad o afección ocular. La tasa de no-cumplimiento y de no-adherencia de los regímenes de tratamiento que requieren viajes repetidos o frecuentes a los consultorios médicos para la administración es mayor entre los pacientes de edad avanzada, que son los más afectados por la DMRE. Por lo tanto, el suministro del afibbercept en el ojo de un paciente a través de la terapia génica, por ejemplo, como una inyección intravítreas de una sola vez puede proporcionar una opción de tratamiento más conveniente para los pacientes y mejorar los resultados de los pacientes al abordar el problema del no-cumplimiento y la no-adherencia.
- En algunos casos, un método de uso comprende el pretratamiento de un paciente o sujeto humano con un fármaco que se considera el estándar actual de cuidado, por ejemplo, la inyección de la proteína afibbercept, la inyección de ranibizumab o la inyección de bevacizumab, la determinación de la capacidad de respuesta del paciente al afibbercept, y la administración de la terapia génica del afibbercept descrita en la presente descripción al paciente que responde al afibbercept. La determinación de la capacidad de respuesta de un paciente al afibbercept puede incluir, pero no se limita a, las pruebas de sangre, el inmunoensayo, los experimentos ex vivo, o la administración de la inyección de proteína afibbercept al paciente y evaluar la capacidad de respuesta del paciente al afibbercept.
- En algunos casos, el método de uso de la terapia génica de afibbercept descrito en la presente descripción incluye reconstituir una forma liofilizada de la composición farmacéutica descrita en la presente descripción (es decir, el rAAV2.7m8 que comprende la secuencia de ácido nucleico del afibbercept) de acuerdo con la etiqueta del fármaco y la administración de dicha terapia génica de afibbercept reconstituida a un sujeto o paciente humano. En algunos

- casos, la terapia génica de afibbercept se proporciona como una suspensión. En algunos casos, la suspensión se agita antes de la administración. En algunos casos, la suspensión se refrigera. En algunos casos, la suspensión refrigerada se calienta a temperatura ambiente antes de la administración. En algunos casos, dicho paciente humano se trató previamente con una inyección de afibbercept u otra inyección de fármaco proteico, por ejemplo, la inyección de ranibizumab o la inyección de bevacizumab. En algunos casos, dicho paciente no recibe más de una inyección o administración de la terapia génica rAAV2.7m8-afibbercept durante al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años; o no recibe más de una inyección o administración de la terapia génica rAAV2.7m8-afibbercept en más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más años.
- 5 10 En algunos casos, en la presente descripción también se describen los métodos para prevenir o tratar una afección o enfermedad ocular, el método que comprende la administración a un individuo que lo necesite, por ejemplo, un individuo con una afección o enfermedad ocular que responde al afibbercept, una cantidad efectiva de un virión de rAAV que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el afibbercept como se describe en la presente descripción o una composición farmacéutica del mismo. En algunos casos, el virión de rAAV2.7m8-afibbercept puede administrarse por inyección intraocular, por inyección intravítreo, por inyección subretiniana, o por 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, intravenoso, tópico, gotas para los ojos, etc. En algunos casos, los métodos y las composiciones farmacéuticas descritos en la presente descripción implican la administración por inyección intravítreo.
- 15 20 En algunos casos, la terapia génica o las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción se proporcionan como una suspensión refrigerada. En algunos casos, la suspensión refrigerada comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, tensioactivo, glicerol, tensioactivo no iónico, solución reguladora, glicol, sal, y cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, se usan el ácido clorhídrico y el hidróxido de sodio para ajustar el pH de la solución. En algunos casos, la suspensión tiene un pH neutro, o un pH entre 6,5 y 7,5. En algunos casos, el pH de la suspensión 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 es ligeramente ácido (por ejemplo, pH de aproximadamente 6,5, 6,3, 6,1, 6, 5,5 o 5). En algunos casos, la suspensión 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, la suspensión refrigerada se almacena a temperaturas entre 35 F y 46 F (2 C y 8 C). En algunos casos, la suspensión refrigerada se calienta a temperatura ambiente antes de la administración a un paciente.
- 25 30 En algunos casos, la terapia génica o las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción se proporcionan como una suspensión refrigerada. En algunos casos, la suspensión refrigerada comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, tensioactivo, glicerol, tensioactivo no iónico, solución reguladora, glicol, sal, y cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, se usan el ácido clorhídrico y el hidróxido de sodio para ajustar el pH de la solución. En algunos casos, la suspensión tiene un pH neutro, o un pH entre 6,5 y 7,5. En algunos casos, el pH de la suspensión 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 es ligeramente ácido (por ejemplo, pH de aproximadamente 6,5, 6,3, 6,1, 6, 5,5 o 5). En algunos casos, la suspensión 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, la suspensión refrigerada se almacena a temperaturas entre 35 F y 46 F (2 C y 8 C). En algunos casos, la suspensión refrigerada se calienta a temperatura ambiente antes de la administración a un paciente.
- 35 35 Una "cantidad terapéuticamente efectiva" como se describe en la presente descripción puede ser un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos clínicos. Para la inyección directamente en el ojo o la inyección intravítreo, una dosis terapéuticamente efectiva puede estar en el orden de 10^{11} a 10^{12} o de 10^{12} a 10^{13} genomas vectoriales del 7m8-afibbercept. En algunos casos, una dosis unitaria o una cantidad terapéuticamente efectiva del 7m8-afibbercept está entre 10^{10} a 10^{11} , entre 10^{11} a 10^{12} , entre 10^{10} a 10^{12} , entre 10^{12} a 10^{13} , entre 10^{11} a 10^{13} , entre 10^{12} a 10^{13} , entre 10^{12} a 10^{14} , entre 10^{11} a 10^{14} , entre 10^{11} a 10^{15} , entre 10^{12} a 10^{15} , entre 10^{13} a 10^{14} , entre 10^{14} a 10^{15} , entre 10^{15} a 10^{16} , entre 10^{16} a 10^{17} , entre 10^{17} a 10^{18} , entre 10^{18} a 10^{19} , o entre 10^{19} a 10^{20} genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de la composición farmacéutica que comprende el 7m8-afibbercept de la divulgación está entre 1×10^{10} a 2×10^{10} , entre 2×10^{10} a 3×10^{10} , entre 3×10^{10} a 4×10^{10} , entre 4×10^{10} a 5×10^{10} , entre 5×10^{10} a 6×10^{10} , entre 6×10^{10} a 7×10^{10} , entre 7×10^{10} a 8×10^{10} , entre 8×10^{10} a 9×10^{10} , entre 9×10^{10} a 10×10^{10} , entre 1×10^{11} a 2×10^{11} , entre 2×10^{11} a 3×10^{11} , entre 3×10^{11} a 4×10^{11} , entre 4×10^{11} a 5×10^{11} , entre 5×10^{11} a 6×10^{11} , entre 6×10^{11} a 7×10^{11} , entre 7×10^{11} a 8×10^{11} , entre 8×10^{11} a 9×10^{11} , entre 9×10^{11} a 10×10^{11} , entre 1×10^{12} a 2×10^{12} , entre 2×10^{12} a 3×10^{12} , entre 3×10^{12} a 4×10^{12} , entre 4×10^{12} a 5×10^{12} , entre 5×10^{12} a 6×10^{12} , entre 6×10^{12} a 7×10^{12} , entre 7×10^{12} a 8×10^{12} , entre 8×10^{12} a 9×10^{12} , entre 9×10^{12} a 10×10^{12} , 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 9×10^{13} a 10×10^{13} genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de 7m8-afibbercept de esta divulgación está entre $2,1 \times 10^{11}$ o entre $2,1 \times 10^{12}$ genomas vectoriales. En algunos casos, la dosis unitaria de rAAV de esta divulgación está 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 vectoriales.
- 40 45 En algunos casos, una dosis unitaria de 7m8-afibbercept de esta divulgación está 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 2×10^{12} , entre 2×10^{12} a 3×10^{12} , entre 3×10^{12} a 4×10^{12} , entre 4×10^{12} a 5×10^{12} , entre 5×10^{12} a 6×10^{12} , entre 6×10^{12} a 7×10^{12} , entre 7×10^{12} a 8×10^{12} , entre 8×10^{12} a 9×10^{12} , entre 9×10^{12} a 10×10^{12} , 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 9×10^{13} a 10×10^{13} genomas vectoriales.
- 45 50 En algunos casos, una dosis unitaria de 7m8-afibbercept de esta divulgación está 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 2×10^{12} , entre 2×10^{12} a 3×10^{12} , entre 3×10^{12} a 4×10^{12} , entre 4×10^{12} a 5×10^{12} , entre 5×10^{12} a 6×10^{12} , entre 6×10^{12} a 7×10^{12} , entre 7×10^{12} a 8×10^{12} , entre 8×10^{12} a 9×10^{12} , entre 9×10^{12} a 10×10^{12} , 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 9×10^{13} a 10×10^{13} genomas vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria de 7m8-afibbercept de esta divulgación está entre $2,1 \times 10^{11}$ o entre $2,1 \times 10^{12}$ genomas vectoriales. En algunos casos, la dosis unitaria de rAAV de esta divulgación está 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 vectoriales.
- 55 60 En algunos casos, una dosis unitaria de 7m8-afibbercept de esta divulgación está 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 2×10^{12} , entre 2×10^{12} a 3×10^{12} , entre 3×10^{12} a 4×10^{12} , entre 4×10^{12} a 5×10^{12} , entre 5×10^{12} a 6×10^{12} , entre 6×10^{12} a 7×10^{12} , entre 7×10^{12} a 8×10^{12} , entre 8×10^{12} a 9×10^{12} , entre 9×10^{12} a 10×10^{12} , 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 9×10^{13} a 10×10^{13} genomas vectoriales.
- 65 65 En algunos casos, la cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción comprende entre los genomas vectoriales 2E12 y 6E12. 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 vectoriales. En algunos casos, una dosis unitaria comprende entre 1E12 a 1,5E12, entre 1,5E12 a 2E12, entre 2E12 a 2,5E12, entre 2,5E12 a 3,0E12, entre 3,0E12 a 3,5E12, entre 3,5E12 a 4,0E12, entre 4,0E12 a 4,5E12, entre 4,5E12 a 5,0E12, entre 5,0E12 a 5,5E12, entre 5,5E12 a 6,0E12, entre 6,0E12 a 6,5E12, entre 6,5E12 a 7,0E12, entre 7,0E12 a 7,5E12, entre 7,5E12 a 8,0E12, entre 8,0E12 a 8,5E12, entre 8,5E12 a 9,0E12, entre 9,0E12 a 9,5E12, o entre 9,5E12 a 10E12 genomas vectoriales. 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 vectoriales. 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 vectoriales.

En algunos casos, la cantidad total del 7m8-aflibercept inyectado en un paciente o sujeto humano en un período de 2 a 5 años o de 5 a 10 años no es 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 vectoriales, 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 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 vectoriales.

En algunos casos, el virión de rAAV.7m8-aflibercept o una composición farmacéutica del mismo puede administrarse como una dosis única o una dosis de una vez. 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 intravítreo del 7m8-aflibercept evita la necesidad de que el paciente reciba una inyección de proteína aflibercept durante al menos 1 año, 1,5 años, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30 o más años.

Ejemplos

Ejemplo 1: Evaluación de la eficacia del rAAV2.7m8-aflibercept en monos

Se ha postulado que el suministro de un transgén terapéutico (o carga útil) en las células o los tejidos objetivo a través de la terapia génica depende en gran medida de las proteínas de la cápside de AAV y su función en dirigir el virus de AAV hacia las células objetivo o relevantes en un primate o sujeto humano. También se ha reportado que la variante 7m8 muestra un aumento de la infectividad o el direccionamiento de las células de la retina cuando se inyecta por vía intravítreo. Por lo tanto, cabría esperar que la variante 7m8 funcionara de forma similar dirigiendo varios transgenes terapéuticos a las células de la retina cuando se inyecta por vía intravítreo.

Objetivo: Evaluar la eficacia de un rAAV2.7m8 que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el aflibercept con la de un rAAV2.7m8 que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el sVEGFR-1 después de la administración intravítreo (IVT) de cada terapia génica a una dosis de 2×10^{12} gv para inhibir el desarrollo de la neovascularización coroidea (NVC) inducida por la fotocoagulación con láser en monos verdes africanos. La secuencia de ácido nucleico del sVEGFR-1 (también conocida como sFLT-1) está disponible públicamente, por ejemplo, como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos. 2014/0371438.

La **Figura 5** ilustra la secuencia de ácido nucleico del aflibercept. La **Figura 6** ilustra la secuencia de ácido nucleico del sFLT-1 (SEQ ID NO: 3).

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

Los monos se sometieron a pruebas de referencia para evaluar la salud ocular y general por tonometría, biomicroscopía con lámpara de hendidura, fundoscopía, fotografía a color de fondo de ojo (CFP), angiografía de fluorescencia (FA) y tomografía de coherencia óptica (OCT). Los monos con hallazgos normales se inscribieron en el estudio y se asignaron al azar en tres grupos de tratamiento por el peso corporal de referencia y el género (**Tabla 1**). Se aplicó ungüento oftálmico de atropina al 1 % después del examen de referencia.

Como se usa en la presente descripción, el rAAV2.7m8-sVEGFR-1 comprende rAAV2 que comprende la inserción de 7m8 entre las posiciones 587 y 588 en la proteína de la cápside VP1 de rAAV2 y una secuencia de ácido nucleico que codifica el sVEGFR-1.

Tabla 1: Asignación del tratamiento

5	Grupo	N	Tratamiento OU	Ruta	Dosis (µL)	Láser OU	Lámpara de hendidura y CFP	FA** y OCT	Recolección de tejido y terminal
10	1	6	AAV2.7m8-aflibercept	IVT; Día 0	1x100 µL	Día 56			
15	2	6	Vehículo	IVT; Día 0	1x100 µL	Día 56			
20	3	6	AAV2.7m8-sVEGFR-1	IVT; Día 0	1x100 µL	Día 56			
25	4	3	Eylea® (aflibercept)	IVT; Día 56	1x30 µL	Día 56	Día 84	Referencia, día 70 y 84	

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

El día 0 del estudio, los monos de los grupos 1-3 recibieron AAV2.7m8-aflibercept intravítreo (IVT), vehículo, o AAV2.7m8-sVEGFR-1 OU de acuerdo con el programa de tratamiento (**Tabla 1**). Antes de la dosificación IVT, se administró anestesia local tópica (proparacaina al 0,5 %) y los ojos pueden desinfectarse con Betadine al 5 % y enjuagarse con solución salina normal estéril. Las inyecciones IVT se administraron mediante el uso de una aguja de 0,5 pulgadas de calibre 31 colocada 2 mm por detrás del limbo en el cuadrante temporal inferior, dirigida al vítreo central.

El día 56 del estudio, los monos del grupo 4 recibieron aflibercept IVT (EYLEA®, 30 µL de 40 mg/mL/ovo) OU inmediatamente después del tratamiento con láser, siguiendo los procedimientos de inyección IVT idénticos a los de los grupos 1-3, con la excepción del volumen reducido de la inyección (30 µL). La administración IVT de aflibercept es un estándar clínico de cuidado para la NVC y, por lo tanto, se emplea como control positivo en este estudio. La dosis se ajustó para adaptar el volumen relativamente más pequeño del vítreo en el mono verde africano (2,7 mL) en comparación con el humano (4 mL).

Todas las inyecciones IVT se siguieron por la administración tópica de ciprofloxacino al 0,3 %, o una solución oftálmica antibiótica equivalente, y ungüento de sulfato de atropina al 1 %.

El día 56 se indujo la NVC entre arcadas vasculares temporales con quemaduras de láser. Un oftalmólogo colocó simétricamente nueve puntos de láser en cada ojo empleando un láser Iridex Oculight TX de 532 nm con una duración de láser de 100 ms, un tamaño de punto de 50 µm, una potencia de 750 mW. Los puntos de láser se aplicaron usando una lente láser de contacto de 0,9x. La localización objetivo de los puntos láser se cartografió por un oftalmólogo entrenado en imágenes a color del fondo de ojo obtenidas antes del tratamiento con láser (y subsecuentes a la colocación de la burbuja) para referencia durante la colocación del punto láser. La fotografía a color del fondo de ojo se realizó inmediatamente después del tratamiento con láser para documentar las lesiones con láser. Se excluyeron de los análisis cualquier punto que demostrara hemorragia retiniana/subretiniana severa inmediatamente después del láser. **La Figura 1** ilustra una fotografía de fondo de ojo ejemplar de un ojo de un primate no humano después de la inducción de lesiones NVC por irradiación con láser sin tratamiento.

Se capturaron imágenes bilaterales a color del fondo de ojo de la retina con 50 grados de visión centrada en la fóvea mediante el uso de una cámara retiniana Topcon TRC-50EX con el hardware de imágenes digitales Canon 6D y el 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 NVC se calificó I-IV (**Tabla 2**) por un oftalmólogo enmascarado que evaluó los compuestos generados después del ajuste uniforme de la intensidad de la imagen. La evaluación de la graduación de la lesión se confirmó en las imágenes del fondo de ojo por otros dos oftalmólogos capacitados. El análisis de densitometría de fluorescencia de las imágenes de angiogramas sin procesar de etapa tardía también puede realizarse mediante el uso del software ImageJ.

60

65

Tabla 2: Escalas de graduación de las lesiones con láser

Grado de la lesión	Definición
I	Sin hiperfluorescencia: Compare el pre-FA con 30 segundos después del FA. Busque la ausencia de hiperfluorescencia en la lesión.
II	Hiperfluorescencia sin fugas - Compare 30 segundos de FA con 3 y 6 minutos de FA. Busque la hiperfluorescencia sin tinción residual significativa en 6 min de FA.
III	Hiperfluorescencia temprana o media en tránsito y fuga tardía - Compare 30 segundos de FA con 3 y 6 minutos de FA. Busque la tinción residual significativa en la lesión a los 6 minutos de FA.
IV	Hiperfluorescencia temprana o media en tránsito y fuga tardía que se extiende más allá de los límites del área tratada - Compare 30 segundos de FA con 3 y 6 minutos de FA. Busque una tinción consistente más allá del borde de la lesión como se ve en los 30 segundos de FA.

Los sujetos se evaluaron dos veces al día para su bienestar general. Se realizaron observaciones detalladas una vez a la semana. Los pesos corporales se obtuvieron en el momento de la prueba de referencia y cada dos semanas durante el estudio en vida.

Todos los animales se sacrificaron con pentobarbital después de la confirmación de la calidad de las imágenes del fondo de ojo en el día 85, o poco después, en espera de la revisión de las imágenes. Los animales se sacrificaron con pentobarbital y se enuclearon los globos. El exceso de tejido orbital se recortó y ambos globos OD y OS se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y luego se disecaron a lo largo de los planos del tejido congelado a temperatura ambiente para aislar el vítreo y la retina con los sub-tejidos coroideos. Después de la recolección del vítreo, se tomaron punciones de 5 mm de la retina neural con RPE/coroídes de la mácula y las regiones superior, inferior, temporal y nasal. La retina con los tejidos subyacentes de RPE/coroídes de cada punzón se transfirió a los criotubos marcados tarados previamente, y se pesó y se congeló instantáneamente en nitrógeno líquido. Antes y después de la recolección de las biopsias de los punzones, se tomó una fotografía de la retina montada en el plano con indicación de la orientación para documentar las regiones de las que se recolectaron los punzones.

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

Las lesiones NVC se indujeron por irradiación con láser inmediatamente después de la inyección en cada grupo de sujetos de prueba (monos), y se usó una fotografía a color del fondo de ojo para clasificar cada lesión en una escala de I-IV. La Figura 2 ilustra una fotografía del fondo de ojo ejemplar usada para evaluar las lesiones de los monos en el día 70 después del tratamiento con el AAV2.7m8-aflibercept o el vehículo control intravítreo a una dosis de $2,1 \times 10^{12}$ gv. Un mono tratado con el AAV2.7m8-aflibercept mostró lesiones de grado II y III y ninguna lesión de grado IV, mientras que un mono tratado con el vehículo control mostró más lesiones de grado IV. Los datos similares de múltiples monos se agruparon y representaron para el análisis cuantitativo de cada grupo de prueba que se describe más abajo (Figuras 3 y 4).

La Figura 3 ilustra un gráfico del porcentaje de lesiones de grado IV el día 14 y el día 28 de los monos del grupo 4 inyectados por vía intravítreo con EYLEA® como control positivo (o la proteína de fusión aflibercept sin el enfoque de la terapia génica) o un vehículo control que comprende la solución reguladora de la formulación solamente. Se administraron 30 μ L de 40 mg/mL/ovo de EYLEA® OU inmediatamente después de la irradiación con láser, siguiendo los procedimientos de inyección IVT idénticos a los usados para los grupos 1-3 (Tabla 1) con la excepción del volumen reducido de inyección (30 μ L) para adaptar el volumen relativamente menor del vítreo en el mono verde africano (2,7 mL) en comparación con el humano (4 mL). La administración IVT de EYLEA® es un estándar clínico de cuidado para la NVC y, por lo tanto, se emplea como control positivo en este estudio. Los datos de varios monos se promediaron y se graficaron para el análisis cuantitativo. Los animales tratados con inyección intravítreo de EYLEA® mostraron una disminución significativa en la cantidad de lesiones de grado IV en comparación con la administración del vehículo solo por inyección intravítreo, medida por las imágenes del fondo de ojo recogidas el día 14 y el día 28 después de la inyección.

La Figura 4 ilustra un gráfico del porcentaje de lesiones de grado IV en el día 14 y en el día 28 de los monos (grupos 1-3 en la Tabla 1) inyectados por vía intravítreo con el rAAV2.7m8-aflibercept (que es una terapia génica que comprende rAAV2 con la variante 7m8 de la proteína de la cápside y la secuencia de ácido nucleico del aflibercept); o el AAV2.7m8-sVEGFR-1 (que es una terapia génica que comprende rAAV2 con la variante 7m8 de la proteína de la cápside y la secuencia de ácido nucleico sVEGFR-1), cada una a una dosis de $2,1 \times 10^{12}$ gv, o un vehículo control que comprende la solución reguladora de la formulación solamente. Las lesiones NVC se indujeron por irradiación con láser, y se usó una fotografía a color del fondo de ojo para graduar cada lesión en una escala de I-IV. Las

mediciones del porcentaje de lesiones de grado IV se agruparon y se graficaron. Los monos tratados con la inyección intravítreo de rAAV2.7m8-afiblbercept mostraron una disminución significativa en la cantidad de lesiones de grado IV en comparación con el vehículo control solo para las imágenes del fondo de ojo recolectadas el día 14 y el día 28. Por el contrario, y de forma inesperada, los monos tratados con la inyección intravítreo de rAAV2.7m8-sVEGFR-1 mostraron poca o ninguna reducción de las lesiones NVC de grado IV en comparación con el vehículo control. Estos datos sugieren que la variación de la cápside y/o la vía de administración pueden no funcionar para todos los transgenes, lo que es contrario a lo que muchos habían pensado anteriormente, y que las propiedades del transgén pueden desempeñar una función importante en la eficacia de la terapia génica de AAV. Estos datos *in vivo* en monos también ilustraron que el tratamiento de los primates con el rAAV2.7m8-afiblbercept condujo a menos lesiones de grado IV en comparación con los monos que recibieron el vehículo control solo, lo que sugiere que el rAAV2.7m8-afiblbercept puede ser una opción de terapia génica viable para los humanos.

Estos estudios *in vivo* del rAAV2.7m8-afiblbercept mostraron que el rAAV2 que comprende la variante 7m8 de la proteína de la cápside puede ser efectiva como una terapia génica para el suministro de una secuencia de ácido nucleico que codifica el afiblbercept a las células de la retina de un sujeto por inyección intravítreo, y resulta en una expresión de afiblbercept activo *in vivo* de manera que ejerza un efecto terapéutico, es decir, la reducción de las lesiones NVC, a niveles que son similares al efecto terapéutico del control positivo EYLEA®.

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, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene al menos un 95 % de homología con el afibbercept, y
 - (b) un excipiente farmacéuticamente aceptable;
 - 10 para el uso en un método de tratamiento de una afección o enfermedad ocular, el método comprende administrar una dosis unitaria de la composición farmacéutica por inyección intravítreo en el ojo de un sujeto primate que lo necesita.
 - 15 2. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la afección o enfermedad ocular es degeneración macular relacionada con la edad (DMRE) neovascular (húmeda), edema macular después de la oclusión de la vena retiniana, edema macular diabético (EMD) o retinopatía diabética asociada con el EMD.
 - 20 3. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la afección o enfermedad ocular es la neovascularización coroidea o DMRE húmeda.
 - 25 4. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polipéptido codificado por el ácido nucleico comprende una secuencia que tiene una homología del 100 % con el afibbercept.
 - 30 5. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la dosis unitaria es: (a) entre 1E12 a 1E13 genomas vectoriales; (b) entre 2E12 a 6E12 genomas vectoriales; (c) entre 1E9 a 3E13 genomas vectoriales; (d) entre 1E10 a 3E12 genomas vectoriales; o (e) entre 1E8 a 3E14 genomas vectoriales.
 - 35 6. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la dosis unitaria está: (a) en un volumen que no es superior a 100 µL; o (b) en un volumen que no es superior a 50 µL.
 7. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sujeto es un ser humano.
 - 40 8. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sujeto responde al afibbercept.
 9. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el sujeto se ha tratado previamente con el afibbercept.
 - 45 10. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la administración por inyección intravítreo se produce no más de una vez en al menos 2 años.
 11. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la administración por inyección intravítreo se produce no más de una vez en 5 años.
 - 50 12. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde la administración por inyección intravítreo es una administración única.
 13. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición farmacéutica es una suspensión.
 - 55 14. La composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además agitar la suspensión para asegurar una distribución uniforme de la suspensión antes de la etapa de administración.
 15. La composición para el uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además calentar la composición farmacéutica a temperatura ambiente antes de la etapa de administración.

Figura 1

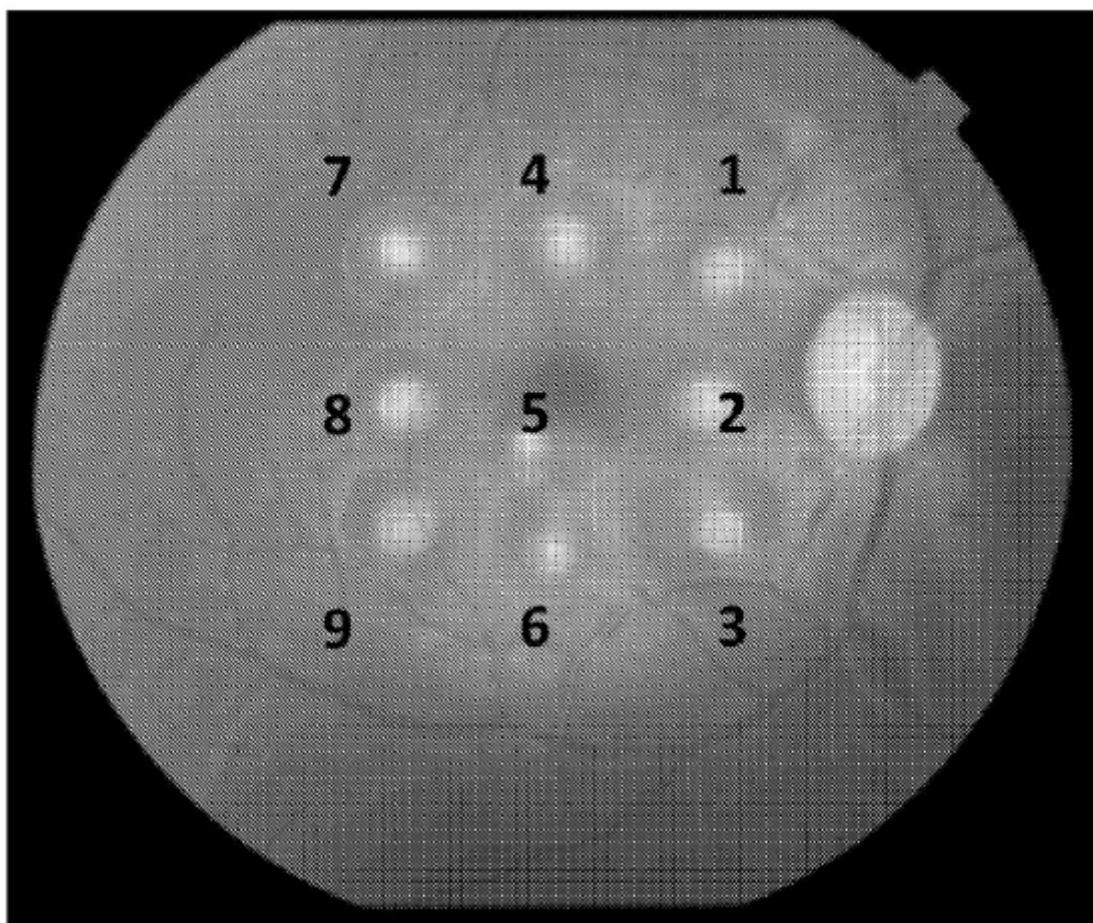


Figura 2

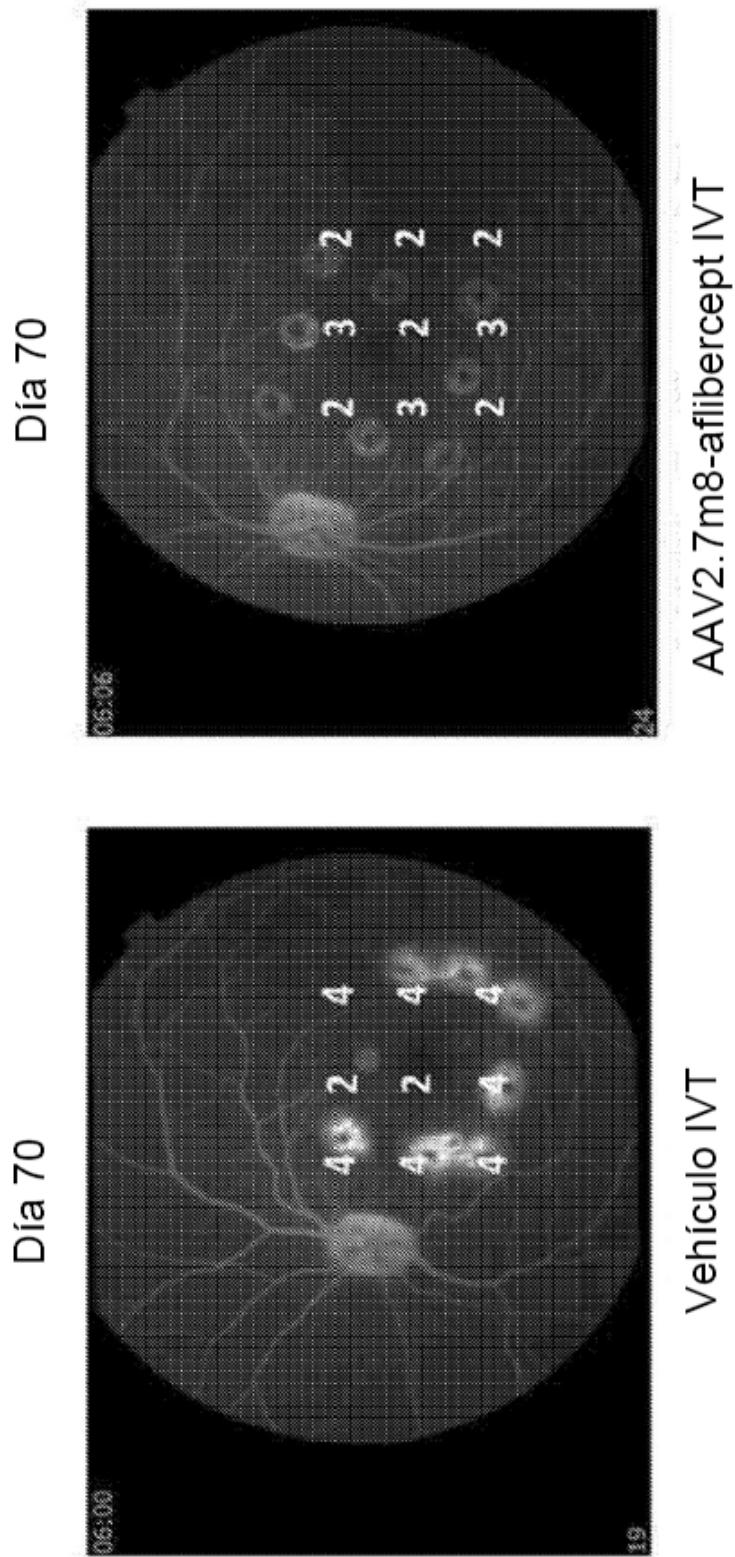


Figura 3

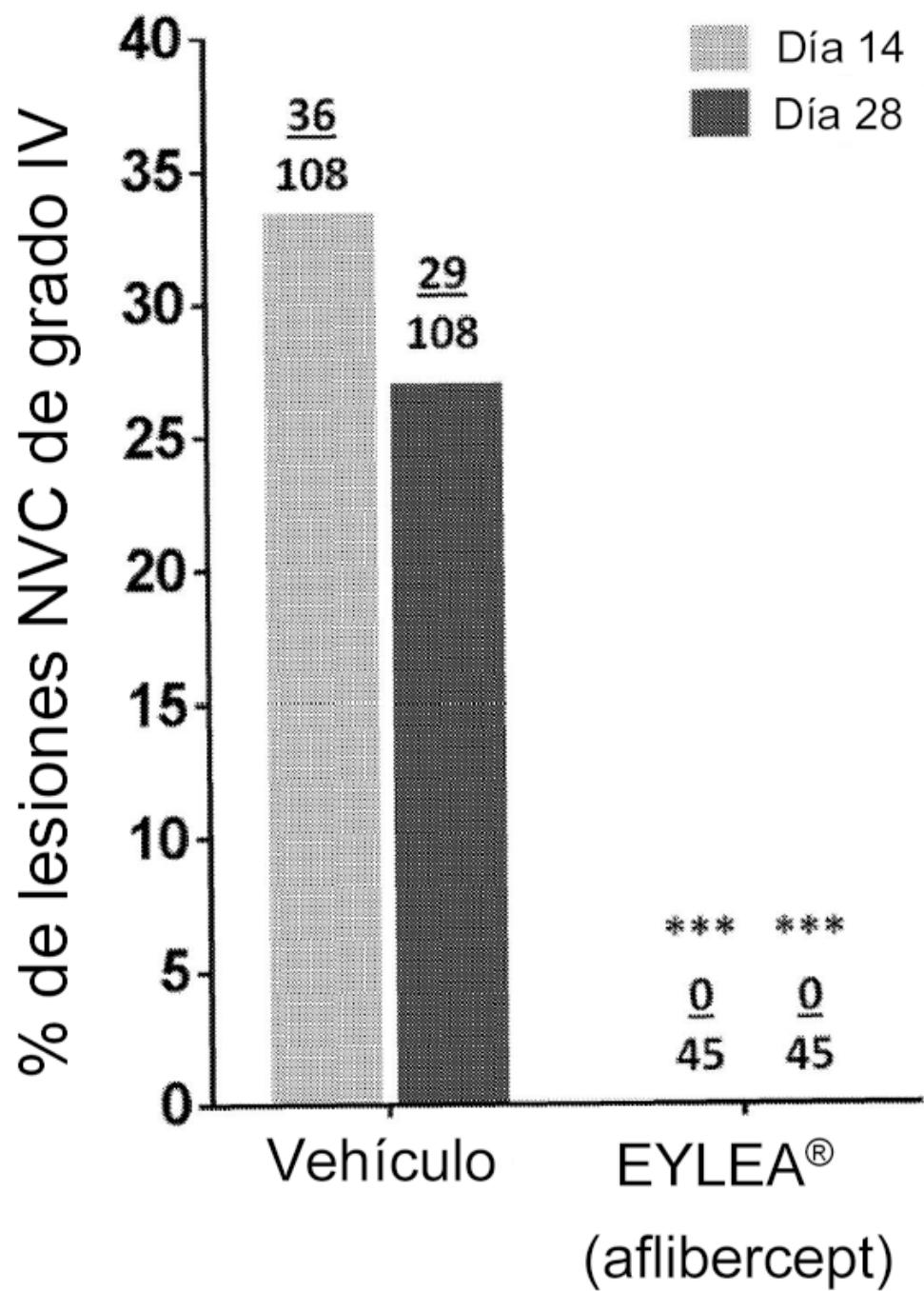


Figura 4

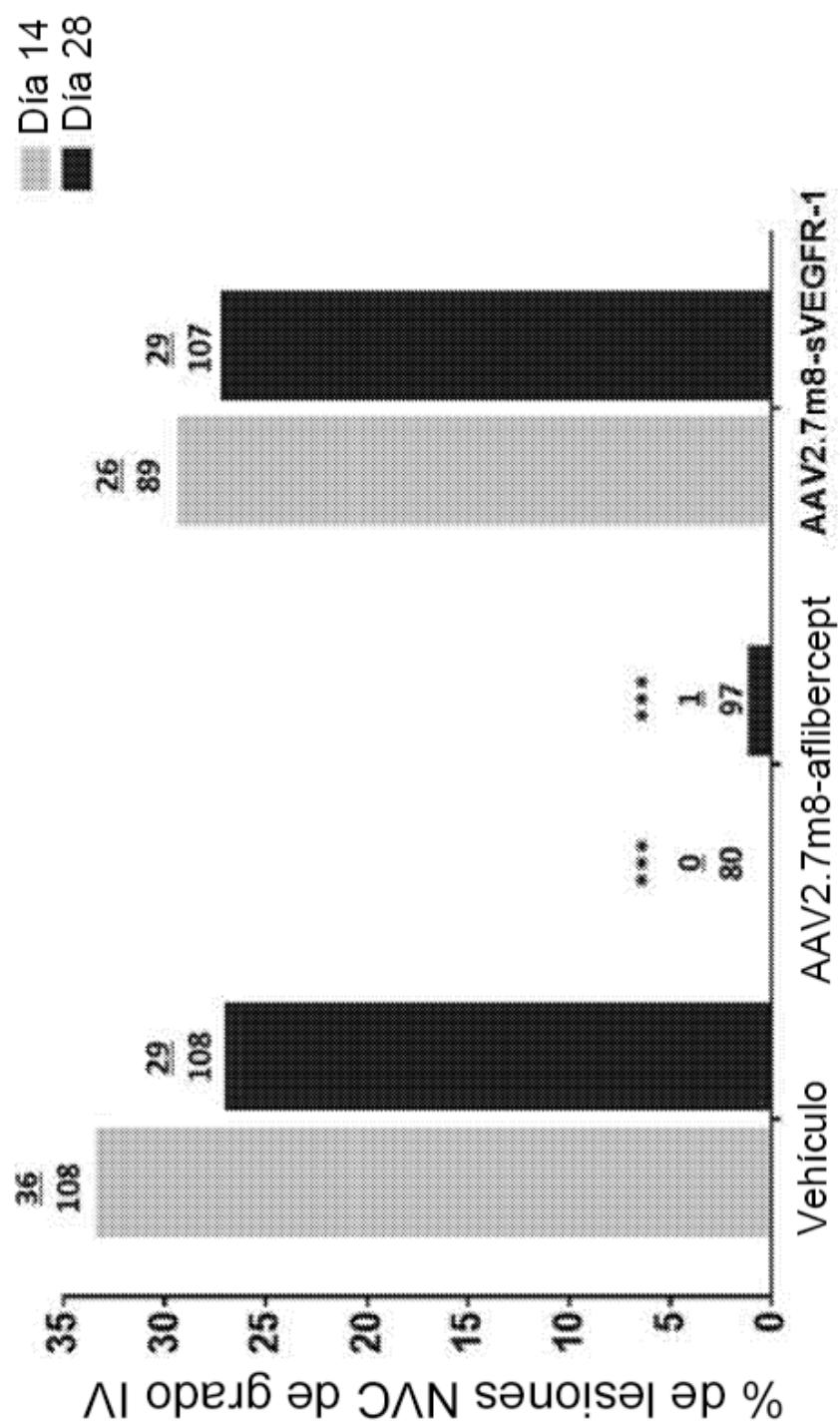


Figura 5

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGCCTGCTGTGCGCGCTGCTC
AGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCCGGAAGTGATAACCGGT
AGACCTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATTATACAC
ATGACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCATTCCCTGCCGGGTTACGTCA
CCTAACATCACTGTTACTTAAAAAAGTTCCACTGACACTTG
ATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTT
CATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCT
GTGAAGCAACAGTCAATGGCATTGTATAAGACAAACTATCTC
ACACATCGACAAACCAATACAATCATAGATGTGGTTCTGAGTCCG
TCTCATGGAATTGAACATCTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAAT
TGTACAGCAAGAACTGAACATAATGTGGGGATTGACTTCAACTG
GGAATACCCCTTCTCGAACGCATCAGCATAAGAAACTTGTAAACCG
AGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTGG
GCACCTTAACATAGATGGTGTAAACCGGAGTGACCAAGGATTGT
ACACCTGTGCAGCATCCAGTGGCTGATGACCAAGAACAGC
ACATTTGTCAGGGTCCATGAAAAGGACAAACTCACACATGCC
ACCGTGCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCAGTCTCCT
CTTCCCCCCTAAACCCAAGGACACCCCATGATCTCCGGACCCC
TGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTG
AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT
GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC
GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC
CCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCATCCGGATGAGCTGACCA
AGAACCCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCA
GCGACATGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAAC
AACTACAAGACCAACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTC
TTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA
GGGAAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA
CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

SFLT.1

Figura 6

ATGGTCAGGCTACTGGGACACGGGGCTCTGCTGTGGCGCTCAGCTGCTTCACAGGAATCTGCTTCAAAATTAAAAGAT
 CCTGAACTGAGTTAAAAGGCCACCCAGCACATCATGCCAACGGCAGACACTGCATCTCCAAATGCCAGGGGGAAAGCAGCCCCATAATGTC
 TTTGCCGAAATGGTGAGTAAGGAAAGGCAAGGGCTGAGGATAACTAAATCTGCTGAACTGGAAAGAANTGGAAACATTCTGGAGTACTTAA
 CCTTGAACACAGCTCAAGCAAACCACACTGGCTCTACAGCTGCAAAATCTAGCTGTAACCTACTCCAAGAAGAAACAGAAATCTGCAA
 TCTATATATTATTAGTGATACAGGTAGACCTTCGTAGAGATGTGAACTGAGTACAGTGAAATCCCAGAAATTACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTG
 TCATTCCTGCCGGGTTACGTACCTGAACTTCACCTGATCTGAACTTGAACAGTCAATGGGCAACAGTCAATGGGCATTGTATAAA
 GACAGTAGAAAGGGGCTTCATCATATAAATGCAACGTAACAAAGGAATAGGGGTTCTGACCTGTGAAGGCAACAGTCAATGGGCATTGTATAAA
 GACAAACTATCTCACACATGACAACAAATACAATCATAGATGTCAAATAAGGCACACCCACGCCAGTCAAATTACTAGAGGCCATACTCT
 GTCTCTCAATTGTACTGCTACCACTCCCTGAACACGGAGGTCAAATGACCTGGAGTTACCCCTGATGAAAAAAATAAGAGGCTTCGTAAGG
 CGACGAAATTGACCAAAGCAATTCCCATGCCAACATATTCTACAGTGTTCTTACTATTGACAACAAAGACAAGGACTTTATACTT
 GTCGTGTAAGGGAGTGGACCATCAITCAAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATAATGATAAAGCATTCACTGTGAACACATGCAAAACAGC
 AGGTGCTTGAACCGTAGCTGGCAAGGGGCTCTACCGGCTCTATGAAAGTGAAGGCATTCCCTGCCGGAAGTTGATGGTTAAAAGATG
 GGTTACCTGCGACTTGAGAAATCTGCTGCTATTGACTCGTAAATTCAAGGACCTAACTGAAAGGGATGCAGGGGAATTATA
 CAATCTTGTGCTGAGCATAAAACAGTCAAATGTGTTAAAACCTCACTGCCACTCTAATTGTCATGTGAAACCCAGATTACGAAAAGGCCT
 GTCATCGTTCCAGACCCGGCTCTACCCACTGGCAGGACAAATCCTGACTTGTACCGCATATGGTATCCCTCAACCTACAAATCAAGTGG
 TTCTGGCACCCCTGTAACCTAACTCATTCGAAAGCAAGGTGTGACTTTGTCATAATGAAAGAGTGGATGCTGACTGCAAGCAACA
 TGGAAGAACAGAAATTGAGAGCATCACTCAGCGCATGGCAATAATGAAAGGAAGAAATAAGATGGCTAGCACCTGGCTGACTCTAGA
 ATTCTGGAATCTACATTGCTAGCTCCAATAAAGTGGGACTGTGGAAAGAAACATAAGCTTATATCACAGATGTGCCAAATGGGTTC
 ATGTTAACCTGGAAAAATGCCGACGGAAAGGAGGGACTGAAACTGCTTGCACAGTTAACAGTTAACAGTTAACAGGACTTACTTGGATT
 TACTGCGGACAGTTAACAGAACATGCACTACAGTATTAGCAAGCAAATAACAGAACATGCACTAACCTAAGGGAGCACTCCATCACTTAACTCTAC
 CATCATGAAATGTTCCCTGCAAGATTCAAGGGCACTATGCCAGAGGCAACTTACACAGGGGAAGGAATGTATACACAGGGGAAGAAATCTCCAGAAAGAA
 TTACAAATCAGAGGTGAGCACTGCCAAACAAAAGGCATCTGGATCTCCAAATTAAAAGCACAAAGGAATGATTGACACACAAAGTA
 ATGAAACATTAA