

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 011 359**

51 Int. Cl.:

C12N 15/864 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2015** **E 21204257 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2024** **EP 4012035**

54 Título: **Vectores víricos adenoasociados para el tratamiento de glaucoma de miocilina (MYOC)**

30 Prioridad:

16.09.2014 US 201462051229 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
07.04.2025

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.00%)
450 Water Street
Cambridge, MA 02141, US

72 Inventor/es:

PECHAN, PETER;
SCARIA, ABRAHAM y
ARDINGER, JEFFERY

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por la
Oficina Europea de Patentes

ES 3 011 359 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

Vectores víricos adenoasociados para el tratamiento de glaucoma de miocilina (MYOC)

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 62/051.299, presentada el 16 de septiembre de 2014.

10 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere en general a vectores de AAV y a métodos de uso de vectores de AAV para tratar glaucoma de miocilina (MYOC).

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las mutaciones de miocilina (MYOC) representan aproximadamente el 2%-4% del glaucoma primario de ángulo abierto (POAG; ~90.000 pacientes estadounidenses). En particular, las mutaciones glaucomatosas MYOC P370L o Y437H representan el 10%-30% de la forma juvenil de POAG (JOAG; ~6.000 pacientes de EE.UU.) y están asociadas con un aumento de la presión intraocular (PIO), muerte de células ganglionares retinianas y daño de cabeza del nervio óptico (ONH) (Shimizu et al. (2000) Am. J. Ophthalmol. 130:165-77; Fan y Wiggs (2010) J. Clin. Invest. 120:3064-72).

A pesar de la asociación entre las mutaciones MYOC y el glaucoma, el efecto de los mutantes MYOC sobre la función ocular sigue siendo poco claro. Por consiguiente, se necesita una comprensión adicional de la función de MYOC y MYOC mutante para descubrir nuevas estrategias terapéuticas para tratar el glaucoma de miocilina (MYOC).

Pechan et al. (2015) Investigative Ophthalmology & Visual Science 56(7) se refiere al papel de los mutantes de miocilina y la señalización de Wnt en el glaucoma. Kim et al. (2008) Molecular Biology of the Cell 19(6), 2588-2596, se refiere a una comparación de miembros de la familia R-espondina en la regulación de la vía Wnt. Kwon et al. (2009) Molecular and Cellular Biology 29(8), 2139-2154, se refiere a un estudio de las funciones de la miocilina humana y sus dos fragmentos proteolíticos. Buie et al. (2010) Investigative Ophthalmology & Visual Science 51(1), 236-248, se refiere a una investigación sobre la capacidad de los vectores de AAV para inducir el suministro seguro a largo plazo de transgenes a la malla trabecular de animales vivos. El documento de patente WO 2009/046059 A1 se refiere a métodos para suministrar moléculas de ARN interferente usando un vector de AAV autocomplementario a un ojo de un paciente para tratar trastornos oculares. El documento de patente WO 2005/079815 A2 se refiere al tratamiento para una enfermedad autosómica dominante del ojo tal como retinitis pigmentosa o glaucoma que comprende medios para suprimir sustancialmente todos los alelos de un gen asociado con la enfermedad. El documento de patente WO 2005/117938 A2 se refiere a ARNip específico para miocilina y miocilina mutante, y a métodos de tratamiento de afecciones y/o enfermedades oculares.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

45 La invención se expone en el conjunto de reivindicaciones adjunto.

La invención proporciona una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica R-espondina 1 (RSPO1), R-espondina 2 (RSPO2) o R-espondina 4 (RSPO4) para su uso en un método de tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, en donde dicho método comprende administrar dicha partícula de rAAV al ojo del mamífero, y en donde RSPO1, RSPO2 o RSPO4 está unido operativamente a un promotor, en donde: (i) el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en el ojo del mamífero; y/o (ii) el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en células de la malla trabecular.

La invención también proporciona una partícula de AAV recombinante que comprende un vector de AAV, en donde el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO1, RSPO2 o RSPO4, y en donde RSPO1, RSPO2 o RSPO4 está unido operativamente a un promotor, en donde: (i) el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en el ojo del mamífero; y/o (ii) el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en células de la malla trabecular, opcionalmente en donde el ácido nucleico codifica además un ácido nucleico inhibidor que se dirige a la expresión de una miocilina (MYOC) en un mamífero.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La información técnica expuesta a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de la invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas. La información técnica adicional se proporciona para situar la invención actual en un contexto técnico más amplio e ilustrar posibles avances técnicos relacionados.

Cualquier referencia incidental a métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante cirugía o terapia y métodos de diagnóstico puestos en práctica en el cuerpo humano o animal no debe interpretarse como que reivindica protección para dichos métodos como tales, sino que en su lugar debe interpretarse como referencia a productos, en particular sustancias o composición, para su uso en cualquiera de esos métodos.

La divulgación se refiere a métodos de tratamiento de glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, que comprenden administrar al ojo del mamífero un agente que aumenta la señalización de Wnt en el ojo del mamífero. Por consiguiente, la divulgación proporciona un agente que aumenta la señalización de Wnt en el ojo de un mamífero, para su uso en métodos de tratamiento de glaucoma de miocilina (MYOC) en el mamífero. En algunos casos, el agente aumenta la señalización de Wnt en una célula de malla trabecular (TM) del ojo del mamífero. En algunos casos, el

agente aumenta la actividad de R-espondina 1 (RSPO1), R-espondina 2 (RSPO2), R-espondina 3 (RSPO3) y/o R-espondina 4 (RSPO4) en el ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el agente se usa en combinación con uno o más agentes adicionales que aumentan una o más actividades de RSPO en el ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el agente aumenta RSPO1 en la TM del ojo del mamífero. En algunos casos, el agente es RSPO1 o una variante funcional de la misma. En algunos casos, el agente es una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO1 o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, RSPO1 es una RSPO1 truncada. En algunas realizaciones, el agente aumenta RSPO2 en la TM del ojo del mamífero. En algunos casos, el agente es RSPO2 o una variante funcional de la misma. En algunos casos, el agente es una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO2 o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, RSPO2 es una RSPO2 truncada. En algunos casos, el agente aumenta RSPO3 en la TM del ojo del mamífero. En algunos casos, el agente es RSPO3 o una variante funcional de la misma. En algunos casos, el agente es una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO3 o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, RSPO3 es una RSPO3 truncada. En algunas realizaciones, el agente aumenta RSPO4 en la TM del ojo del mamífero. En algunos casos, el agente es RSPO4 o una variante funcional de la misma. En algunos casos, el agente es una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO4 o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, RSPO4 es una RSPO4 truncada. De acuerdo con la invención, el agente es una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2 o RSPO4, en donde RSPO1, RSPO2 o RSPO4 está unido operativamente a un promotor, en donde: (i) el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en el ojo del mamífero; y/o (ii) el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en células de la malla trabecular.

En algunos aspectos, la invención proporciona administrar un segundo agente que aumenta la señalización de Wnt en el ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el segundo agente aumenta la señalización de Wnt en la TM del ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el segundo agente reduce o inhibe la expresión de miocilina (MYOC) en el ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el segundo agente reduce o inhibe la expresión de MYOC en la TM del ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el segundo agente es una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica un ácido nucleico inhibidor que se dirige a la expresión de MYOC. En algunas realizaciones, el ácido nucleico inhibidor es una iARN de MYOC que se dirige a la expresión de MYOC. En algunas realizaciones, la iARN de MYOC es ARNhc de MYOC que se dirige a la expresión de MYOC.

En algunos aspectos, el agente reduce o inhibe la expresión de miocilina (MYOC) en el ojo del mamífero. En algunos casos, el agente reduce o inhibe la expresión de MYOC en la TM del ojo del mamífero. En algunos casos, el agente es

una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica un ácido nucleico inhibidor que se dirige a la expresión de MYOC. En algunos casos, el ácido nucleico inhibidor es una iARN de MYOC que se dirige a la expresión de MYOC. En casos adicionales, la iARN de MYOC es ARNhc de MYOC que se dirige a la expresión de MYOC.

En algunas realizaciones de la invención, los métodos comprenden además administrar un segundo agente que aumenta la señalización de Wnt en el ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el segundo agente aumenta la señalización de Wnt en la TM del ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el segundo agente aumenta la actividad de R-espondina 1 (RSPO1), R-espondina 2 (RSPO2), R-espondina 3 (RSPO3) o R-espondina 4 (RSPO4) en el ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el segundo agente aumenta RSPO1 en la TM del ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el segundo agente es RSPO1 o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, el segundo agente es una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO1 o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, RSPO1 es una RSPO1 truncada. En algunas realizaciones, el segundo agente aumenta RSPO2 en la TM del ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el segundo agente es RSPO2 o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, el segundo agente es una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO2 o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, RSPO2 es una

RSPO2 troncada. En algunas realizaciones, el segundo agente aumenta RSPO3 en la TM del ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el segundo agente es RSPO3 o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, el segundo agente es una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO3 o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, RSPO3 es una RSPO3 troncada. En algunas realizaciones, el segundo agente aumenta RSPO4 en la TM del ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el segundo agente es RSPO4 o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, el segundo agente es una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO4 o una variante funcional de la misma. En algunas realizaciones, RSPO4 es una RSPO4 troncada.

En algunos casos, la divulgación se refiere a métodos de tratamiento de glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, que comprende administrar al ojo del mamífero una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas. De acuerdo con la invención, la partícula de rAAV para su uso en un método de tratamiento de glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2 o RSPO4. En algunos casos, la presente divulgación se refiere a métodos de tratamiento de glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, que comprenden administrar al ojo del mamífero una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica una iARN de MYOC que se dirige a la expresión de una miocilina (MYOC)

en el mamífero. En otros casos, la divulgación se refiere a métodos de tratamiento de glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, que comprenden administrar al ojo del mamífero un agente que aumenta la señalización de Wnt en el ojo del mamífero y un agente que reduce o inhibe la expresión de miocilina en el mamífero. En otros casos, la divulgación se refiere a métodos de tratamiento de glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, que comprenden administrar al ojo del mamífero una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas, y una partícula de rAAV que comprende un vector que codifica una iARN de MYOC que se dirige a la expresión de una miocilina en el mamífero. En otros casos más, la divulgación se refiere a métodos de tratamiento de glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, que comprenden administrar al ojo del mamífero una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas, y que codifica un ARNhc de MYOC que se dirige a la expresión de una miocilina (ARNhc de MYOC) en el mamífero. En algunas realizaciones, la iARN es un ARNhc que se dirige a MYOC. En algunas realizaciones, el ARNhc reduce o inhibe la expresión de MYOC.

En algunos casos, la divulgación se refiere a métodos de mejora de la señalización de Wnt en células de malla trabecular en un mamífero que tiene un trastorno ocular, que comprenden administrar al ojo del mamífero una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas. En algunos casos, la divulgación se refiere a métodos de mejora de la señalización de Wnt en células de malla trabecular en un mamífero que tiene un trastorno ocular, que comprenden administrar al ojo del mamífero una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica un ácido nucleico inhibidor que se dirige a la expresión de una miocilina (MYOC) en el mamífero. En otros casos, la divulgación se refiere a métodos de mejora de la señalización de Wnt en células de malla trabecular en un mamífero que tiene un trastorno ocular, que comprenden administrar al ojo del mamífero una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica una iARN de MYOC que se dirige a la expresión de una miocilina (MYOC) en el mamífero. En otros casos, la divulgación se refiere a métodos de mejora de la señalización de Wnt en células de malla trabecular en un mamífero que tiene un trastorno ocular, que comprenden administrar al ojo del mamífero una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas, y una partícula de rAAV que comprende un vector que codifica una iARN de MYOC que se dirige a la expresión de una miocilina en el mamífero. En otros casos, la divulgación se refiere a métodos de mejora de la señalización de Wnt en células de malla trabecular en un mamífero que tiene un trastorno ocular, que comprenden

administrar al ojo del mamífero una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas, y que codifica una iARN de MYOC que se dirige a la expresión de una miocilina en el mamífero. En algunos casos, el trastorno ocular es glaucoma de miocilina (MYOC).

En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano. En algunas realizaciones de la invención, el glaucoma de miocilina (MYOC) se asocia con una mutación en una miocilina. En algunas realizaciones, el glaucoma de miocilina (MYOC) se asocia con una mutación en una miocilina humana. En algunas realizaciones, la mutación de miocilina comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de E323K, K398R, Q368X, G364V, P370L, D380A, K423E, Y437H e I477S. En algunas realizaciones, la mutación de miocilina comprende una sustitución de aminoácido P370L. En algunas realizaciones, la mutación de miocilina comprende una sustitución de aminoácido Y437H. En algunas realizaciones, el glaucoma de miocilina (MYOC) es glaucoma primario de ángulo abierto (POAG). En algunas realizaciones, el glaucoma de miocilina (MYOC) es la forma juvenil de

glaucoma primario de ángulo abierto (JOAG). En algunas realizaciones de la invención, el tratamiento reduce un síntoma de glaucoma de miocilina (MYOC). En algunas realizaciones, la reducción de un síntoma de glaucoma de miocilina (MYOC) es una reducción de la presión intraocular, la reducción de la acumulación de MYOC en la malla trabecular, la reducción de la hipertensión ocular o el aumento del flujo de salida acuoso de la malla trabecular.

En algunas realizaciones, RSPO1 es una RSPO1 humana. En algunas realizaciones, RSPO1 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con RSPO1 humana. En algunas realizaciones, RSPO1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, RSPO1 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO:8. En algunas realizaciones, RSPO1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, RSPO1 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, RSPO1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, RSPO1 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 12. En algunas realizaciones, RSPO2 es una RSPO2 humana. En algunas realizaciones, RSPO2 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con RSPO2 humana. En algunas realizaciones, RSPO2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9. En algunas realizaciones, RSPO2 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO:9. En algunas realizaciones, RSPO2 comprende la secuencia de aminoácidos

de SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, RSPO2 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, RSPO2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, RSPO2 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 14. En algunas realizaciones, RSPO3 es una RSPO3 humana. En algunos casos, RSPO3 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con RSPO3 humana. En algunas realizaciones, RSPO3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1. En algunos casos, RSPO3 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, RSPO3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15. En algunos casos, RSPO3 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO:15. En algunas realizaciones, RSPO3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16. En algunas realizaciones, RSPO3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:17. En algunos casos, RSPO3 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO:17. En algunas realizaciones, RSPO4 es una RSPO4 humana. En algunas realizaciones, RSPO4 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con RSPO4 humana. En algunas realizaciones, RSPO4 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, RSPO4 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO:10. En algunas realizaciones, RSPO4 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:18. En algunas realizaciones, RSPO4 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones, RSPO4 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:19. En algunas realizaciones, RSPO4 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO:12. En algunos casos, RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, y/o variante funcional de las mismas se une operativamente a un promotor. En algunos casos, el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 y/o variante funcional de las mismas en el ojo del mamífero. En algunos casos, el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 y/o variante funcional de las mismas en células de la malla trabecular. De acuerdo con la invención, RSPO1, RSPO2 o RSPO4 se une operativamente a un promotor, en donde el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en el ojo del mamífero y/o el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en células de la malla trabecular. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor híbrido de β -actina de pollo (CBA).

En algunas realizaciones, la iARN de MYOC que se dirige a la expresión de MYOC usada en la invención se dirige a MYOC humana. En algunas realizaciones, la iARN es un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un microARN (miARN) o un ARN horquillado pequeño (ARNhc). En algunas realizaciones, la iARN de MYOC es un ARNhc de MYOC. En algunas realizaciones, el ARNhc se dirige a la secuencia de aminoácidos de MYOC expuesta en SEQ ID NO:6. En algunas realizaciones, el ARNhc comprende la secuencia del bucle de SEQ ID NO:7. En algunas realizaciones, la iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) está unido operativamente a un promotor. En algunas realizaciones, el promotor es capaz de expresar la iARN de MYOC (*por ejemplo*, ARNhc) en el ojo del mamífero. En realizaciones adicionales, el promotor es capaz de expresar la iARN de MYOC (*por ejemplo*, ARNhc) en células de la malla trabecular. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor híbrido de β -actina de pollo (CBA). En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de la ARN polimerasa III. En algunas realizaciones, la expresión de iARN de MYOC (*por ejemplo*, ARNhc) reduce o inhibe la expresión de MYOC en el ojo del mamífero. En algunas realizaciones, la expresión de iARN de MYOC (*por ejemplo*, ARNhc) reduce o inhibe la expresión de MYOC en las células de la malla trabecular del mamífero. En algunas realizaciones, la MYOC es una MYOC natural. En algunas

realizaciones, la MYOC es una MYOC mutante. En algunas realizaciones, la MYOC es una MYOC natural y una MYOC mutante. En realizaciones adicionales, la MYOC mutante comprende sustituciones de aminoácidos correspondientes a sustituciones de aminoácidos P370L y/o Y437H de MYOC humana. En algunas realizaciones, la mutación de miocilina comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas de E323K, K398R, Q368X, G364V, P370L, D380A, K423E, Y437H e I477S.

En algunas realizaciones de los aspectos y realizaciones descritos anteriormente, la partícula vírica de AAV comprende un AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 (por ejemplo, una cápside de AAV6 natural o una cápside de AAV6 variante, tal como ShH10, tal como se describe en la publicación previa a la concesión de EE. UU. 2012/0164106), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9 (por ejemplo, una cápside de AAV9 natural, o una cápside de AAV9 modificada como se describe en la publicación previa a la concesión de EE. UU. 2013/0323226), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, un mutante de tirosina de la cápside, un mutante de unión a heparina de la cápside, una cápside de AAV2R471A, una cápside de AAVAAV2/2-7m8, una cápside de AAV DJ (por ejemplo, una cápside de AAV-DJ/8, una cápside de AAV-DJ/9 o cualquier otra de las cápsides descritas en la publicación previa a la concesión de EE. UU. 2012/0066783), cápside de AAV2 N587A, cápside de AAV2 E548A, cápside de AAV2 N708A, cápside de AAV V708K, cápside de AAV de cabra, cápside quimérica de AAV1/AAV2, cápside de AAV bovino, cápside de AAV de ratón, cápside de rAAV2/HBoV1, o una cápside de AAV descrita en la patente de Estados Unidos n.º 8.283.151 o la publicación internacional n.º WO/2003/042397. En algunas realizaciones, la partícula vírica de AAV comprende una cápside de AAV que comprende una sustitución de aminoácido en una o más de

las posiciones R484, R487, K527, K532, R585 o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En realizaciones adicionales, una partícula de AAV comprende proteínas de la cápside de un serotipo de AAV de los clados A-F. En algunas realizaciones, la partícula vírica de rAAV comprende una cápside de serotipo 2 de AAV. En realizaciones adicionales, la cápside de serotipo 2 de AAV comprende la proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración con respecto a VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, el vector comprende repeticiones terminales invertidas (ITR) de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAVDJ, AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón. En algunas realizaciones, el vector comprende ITR de serotipo 2 de AAV. En algunas realizaciones, la partícula vírica de AAV comprende una o más ITR y la cápside derivada del mismo serotipo de AAV. En otras realizaciones, la partícula vírica de AAV comprende una o más ITR derivadas de un serotipo de AAV diferente a la cápside de las partículas víricas de rAAV. En algunas realizaciones, la partícula vírica de rAAV comprende una cápside de AAV2, y en donde el vector comprende ITR de AAV2. En realizaciones adicionales, la cápside de AAV2 comprende la proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración con respecto a VP1 de AAV2.

En algunas realizaciones, al menos 1×10^9 copias del genoma de las partículas de rAAV se administran al mamífero. En algunas realizaciones, el AAV se administra a la córnea, a la retina y/o a la esclerótica del ojo del mamífero. En algunas realizaciones, la partícula de AAV se administra mediante inyección intravítrea y/o inyección intracameral. En algunas realizaciones, el rAAV se administra en más de una ubicación del ojo.

En algunos casos, la invención se refiere al tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero en donde el mamífero es un ser humano. En algunas realizaciones, el glaucoma de miocilina (MYOC) es glaucoma primario de ángulo abierto (POAG). En algunas realizaciones, el glaucoma de miocilina (MYOC) es una forma juvenil de glaucoma primario de ángulo abierto (JOAG).

En algunas realizaciones de la invención, las partículas víricas de rAAV están en una composición farmacéutica. En realizaciones adicionales, la composición farmacéutica comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones de los métodos anteriores, el agente (por ejemplo, la partícula de AAV) se usa en combinación con uno o más agentes adicionales que aumentan la actividad de una R-espondina (por ejemplo, RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4).

En algunos casos, la divulgación proporciona partículas de AAV recombinante que comprenden un vector de AAV, en donde el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas. De acuerdo con la invención, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO1, RSPO2 o RSPO4. En otros casos, la divulgación proporciona partículas de rAAV que comprenden un vector que codifica un ácido nucleico inhibidor que se dirige a la expresión de una miocilina (MYOC) en el mamífero. En otros casos, la divulgación proporciona partículas de rAAV que comprenden un vector que codifica una iARN de MYOC que se dirige a la expresión de una miocilina (MYOC) en el mamífero. En otros casos más, la divulgación proporciona partículas de rAAV que comprenden un vector que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas, y que codifica una iARN de MYOC que se dirige a la expresión de una miocilina en el mamífero.

En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO1 o una variante funcional de la misma, y RSPO1 o variante funcional de la misma es una RSPO1 humana. En algunas realizaciones, el

vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO1 o una variante funcional de la misma, y la RSPO1 o variante funcional de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 11 y/o 12. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO1 o una variante funcional de la misma, y la RSPO1 o variante funcional de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 11 y/o 12. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO2 o una variante funcional de la misma, y RSPO2 o variante funcional de la misma es una RSPO2 humana. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO2 o una variante funcional de la misma, y la RSPO2 o variante funcional de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 13 y/o 14. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO2 o una variante funcional de la misma, y la RSPO2 o variante funcional de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 13 y/o 14. En algunos casos, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO3 o una variante funcional de la misma, y la RSPO3 o variante funcional de la misma es una RSPO3 humana. En algunos casos, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO3 o una variante funcional de la misma, y la RSPO3 o variante funcional de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y/o 15-17. En algunos casos, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO3 o una variante funcional de la misma, y la RSPO3 o variante funcional de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y/o 15-17. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO4, y la RSPO4 es una RSPO4 humana. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO4 o una variante funcional de la misma, y la RSPO4 o variante funcional de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 18 y/o 19. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO4 o una variante funcional de la misma, y la RSPO4 o variante funcional de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 18 y/o 19. En casos adicionales, RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional de las mismas, está unida operativamente a un promotor. En casos adicionales, el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o variante funcional de las mismas en el ojo del mamífero. En algunos casos, el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o variante funcional de las mismas en células de la malla trabecular. De acuerdo con la invención, RSPO1, RSPO2 o RSPO4 se une operativamente a un promotor, en donde el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en el ojo del mamífero y/o el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en células de la malla trabecular. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor híbrido de β -actina de pollo (CBA).

En algunas realizaciones, el ácido nucleico inhibidor que se dirige a la expresión de una miocilina (MYOC) en el mamífero es una iARN. En algunas realizaciones, la iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) que se dirige a la expresión de MYOC de la divulgación se dirige a MYOC humana. En algunas realizaciones, la iARN es un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un microARN (miARN) o un ARN horquillado pequeño (ARNhc). En algunas realizaciones, la iARN de MYOC es un ARNhc. En algunas realizaciones, la iARN (por ejemplo, ARNhc) se dirige a la secuencia de aminoácidos de MYOC expuesta en SEQ ID NO:6. En algunas realizaciones, la iARN (por ejemplo, ARNhc) comprende la secuencia de bucle de SEQ ID NO:7. En algunas realizaciones, la iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) está unido operativamente a un promotor. En algunas realizaciones, el promotor es capaz de expresar la iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) en el ojo del mamífero. En realizaciones adicionales, el promotor es capaz de expresar la iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) en células de la malla trabecular. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor híbrido de β -actina de pollo (CBA). En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de la ARN polimerasa III. En algunas realizaciones, la expresión de iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) reduce o inhibe la expresión de MYOC en el ojo del mamífero. En algunas realizaciones, la expresión de iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) reduce o inhibe la expresión de MYOC en las células de la malla trabecular del mamífero. En algunas realizaciones, la MYOC es una MYOC natural. En algunas realizaciones, la MYOC es una MYOC mutante. En algunas realizaciones, la MYOC es una MYOC natural y una MYOC mutante. En realizaciones adicionales, la MYOC mutante comprende sustituciones de aminoácidos correspondientes a las sustituciones de aminoácidos E323K, K398R, Q368X, G364V, P370L, D380A, K423E, Y437H e I477S de MYOC humana. En algunas realizaciones, la MYOC mutante comprende sustituciones de aminoácidos correspondientes a sustituciones de aminoácidos P370L y/o Y437H de MYOC humana. En algunas realizaciones, la mutación de miocilina está asociada

con glaucoma primario de ángulo abierto (POAG). En algunas realizaciones, la mutación de miocilina está asociada con la forma juvenil de glaucoma primario de ángulo abierto (JOAG).

En algunas realizaciones de los aspectos y realizaciones descritos anteriormente, la partícula vírica de AAV comprende un AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 (por ejemplo, una cápside de AAV6 natural o una cápside de AAV6 variante, tal como ShH10, tal como se describe en la publicación previa a la concesión de EE. UU. 2012/0164106), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9 (por ejemplo, una cápside de AAV9 natural, o una cápside de AAV9 modificada como se describe en la publicación previa a la concesión de EE. UU. 2013/0323226), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, un mutante de la cápside de tirosina, un mutante de la cápside de unión a heparina, una

cápside de AAV2R471A, una cápside de AAVAAV2/2-7m8, una cápside de AAV DJ (por ejemplo, una cápside de AAV-DJ/8, una cápside de AAV-DJ/9 o cualquier otra de las cápsides descritas en la publicación previa a la concesión de EE. UU. 2012/0066783), cápside de AAV2 N587A, cápside de AAV2 E548A, cápside de AAV2 N708A, cápside de AAV V708K, cápside de AAV de cabra, cápside quimérica de AAV1/AAV2, cápside de AAV bovino, cápside de AAV de ratón, cápside de rAAV2/HBoV1, o una cápside de AAV descrita en la patente de Estados Unidos n.º 8.283.151 o la publicación internacional n.º WO/2003/042397. En algunas realizaciones, la partícula vírica de AAV comprende una cápside de AAV que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones R484, R487, K527, K532, R585 o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En realizaciones adicionales, una partícula de AAV comprende proteínas de la cápside de un serotipo de AAV de los clados A-F. En algunas realizaciones, la partícula vírica de rAAV comprende una cápside de serotipo 2 de AAV. En realizaciones adicionales, la cápside de serotipo 2 de AAV comprende la proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración con respecto a VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, el vector comprende repeticiones terminales invertidas (ITR) de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón. En algunas realizaciones, el vector comprende ITR de serotipo 2 de AAV. En algunas realizaciones, la partícula vírica de AAV comprende una o más ITR y la cápside derivada del mismo serotipo de AAV. En otras realizaciones, la partícula vírica de AAV comprende una o más ITR derivadas de un serotipo de AAV diferente a la cápside de las partículas víricas de rAAV. En algunas realizaciones, la partícula vírica de rAAV comprende una cápside de AAV2, y en donde el vector comprende ITR de AAV2. En realizaciones adicionales, la cápside de AAV2 comprende la proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración con respecto a VP1 de AAV2.

La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de las partículas de AAV recombinantes descritas en el presente documento. La divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que son adecuadas para cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. La divulgación proporciona usos de una composición farmacéutica y partículas de AAV recombinantes descritas en el presente documento en la fabricación de un medicamento para tratar el glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero. En algunos casos, el mamífero es un ser humano. En algunos casos, el glaucoma de miocilina (MYOC) es glaucoma primario de ángulo abierto (POAG). En algunas realizaciones, el glaucoma de miocilina (MYOC) es una forma juvenil de glaucoma primario de ángulo abierto (JOAG).

En algunos casos, la divulgación proporciona kits para el tratamiento de glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, en donde el kit comprende una partícula vírica de rAAV que comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas; una partícula vírica de rAAV que comprende un vector de AAV, en donde el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica un ácido nucleico inhibidor (por ejemplo, iARN de MYOC que incluye ARNhc) que se dirige a la expresión de una miocilina (MYOC) en el mamífero; y/o una partícula vírica de rAAV que comprende un vector de AAV, en donde el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas, y que codifica una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) que se dirige a la expresión de una MYOC en el mamífero. La invención proporciona un kit para tratar el glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, en donde el kit comprende una partícula de rAAV de la invención. En algunas realizaciones, el kit comprende además instrucciones para su uso en el tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC). En algunas realizaciones, el kit comprende además tampones y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En algunas realizaciones, los kits de la invención comprenden ácido nucleico que codifica una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) que se dirige a la expresión de una MYOC en el mamífero. En algunas realizaciones, la iARN de MYOC se dirige a la expresión de una MYOC humana. En algunas realizaciones, la iARN de MYOC se dirige a la secuencia de aminoácidos de MYOC expuesta en SEQ ID NO:6. En algunas realizaciones, la iARN es un ARN inhibidor pequeño (ARNip), un microARN (miARN) o un ARN horquillado pequeño (ARNhc). En algunas realizaciones, la iARN es un ARNhc. En algunas realizaciones, el ARNhc de MYOC comprende la secuencia de bucle de SEQ ID NO:7. En algunos casos, los kits de la divulgación comprenden un vector de AAV, en donde el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO1 o una variante funcional de la misma, y RSPO1 o variante funcional de la misma es una RSPO1 humana. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO1 o una variante funcional de la misma, y la RSPO1 o variante funcional de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 11 y/o 12. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO1 o una variante funcional de la misma, y la RSPO1 o variante funcional de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 11 y/o 12. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO2 o una variante funcional de la misma, y la RSPO2 o variante funcional de la misma

es una RSPO2 humana. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO2 o una variante funcional de la misma, y la RSPO2 o variante funcional de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 13 y/o 14. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO2 o una variante funcional de la misma, y la RSPO2 o variante funcional de la misma comprende

una secuencia de aminoácidos que tiene un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 13 y/o 14. En algunos casos, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO3 o una variante funcional de la misma, y la RSPO3 o variante funcional de la misma es una RSPO3 humana. En algunos casos, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO3 o una variante funcional de la misma, y la RSPO3 o variante funcional de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y/o 15-17. En algunos casos, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO3 o una variante funcional de la misma, y la RSPO3 o variante funcional de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y/o 15-17. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO4 o una variante funcional de la misma, y RSPO4 o variante funcional de la misma es una RSPO4 humana. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO4 o una variante funcional de la misma, y la RSPO4 o variante funcional de la misma comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 18 y/o 19. En algunas realizaciones, el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO4 o una variante funcional de la misma, y la RSPO4 o variante funcional de la misma comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 18 y/o 19. En algunos casos, RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional de las mismas, se une operativamente a un promotor. En algunos casos, el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o variante funcional de la misma en el ojo del mamífero. En algunos casos, el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o variante funcional de las mismas en células de la malla trabecular. De acuerdo con la invención, RSPO1, RSPO2 o RSPO4 se une operativamente a un promotor, en donde el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en el ojo del mamífero; y/o el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en células de la malla trabecular. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor híbrido de β -actina de pollo (CBA). En algunas realizaciones, la iARN de MYOC se une operativamente a un promotor. En algunas realizaciones, el promotor es capaz de expresar la iARN de MYOC en el ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el promotor es capaz de expresar la iARN de MYOC en células de la malla trabecular. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor híbrido de β -actina de pollo (CBA). En algunos casos, el promotor es un promotor de la ARN polimerasa III. En algunas realizaciones, la expresión de iARN de MYOC reduce o inhibe la expresión de MYOC en el ojo del mamífero. En algunas realizaciones, la expresión de iARN de MYOC

reduce o inhibe la expresión de MYOC en las células de la malla trabecular del mamífero.

En algunas realizaciones, las partículas de AAV descritas en el presente documento pueden usarse en combinación con uno o más agentes adicionales que aumentan la actividad de una R-espondina (por ejemplo, RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4).

En algunas realizaciones, los kits de la invención comprenden una partícula vírica de AAV que comprende un vector y un AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 (por ejemplo, una cápside de AAV6 natural o una cápside de AAV6 variante tal como ShH10, como se describe en la publicación previa a la concesión de EE. UU. 2012/0164106), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9 (por ejemplo, una cápside de AAV9 natural, o una cápside de AAV9 modificada como se describe en la publicación previa a la concesión de EE. UU. 2013/0323226), AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, un mutante de tirosina de la cápside, un mutante de unión a heparina de la cápside, una cápside de AAV2R471A, una cápside de AAVAAV2/2-7m8, una cápside de AAV DJ (por ejemplo, una cápside de AAV-DJ/8, una cápside de AAV-DJ/9 o cualquier otra de las cápsides descritas en la publicación previa a la concesión de EE. UU. 2012/0066783), cápside de AAV2 N587A, cápside de AAV2 E548A, cápside de AAV2 N708A, cápside de AAV V708K, cápside de AAV de cabra, cápside quimérica de AAV1/AAV2, cápside de AAV bovino, cápside de AAV de ratón, cápside de rAAV2/HBoV1, o una cápside de AAV descrita en la patente de Estados Unidos n.º 8.283.151 o la publicación internacional n.º WO/2003/042397. En algunas realizaciones, la partícula vírica de AAV comprende una cápside de AAV que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones R484, R487, K527, K532, R585 o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En realizaciones adicionales, una partícula de AAV comprende proteínas de la cápside de un serotipo de AAV de los clados A-F. En algunas realizaciones, la partícula vírica de rAAV comprende una cápside de serotipo 2 de AAV. En algunas realizaciones, la cápside de serotipo 2 de AAV comprende la proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración con respecto a VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, el vector comprende repeticiones terminales invertidas (ITR) de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón. En algunas realizaciones, el vector comprende ITR de serotipo 2 de AAV. En algunas realizaciones, la partícula vírica de AAV comprende una o más ITR y la cápside derivada del mismo serotipo de AAV. En algunas realizaciones, la partícula vírica de AAV comprende una o más ITR derivadas de un serotipo de AAV diferente a la cápside de las partículas víricas de rAAV. En algunas realizaciones, la partícula vírica de rAAV comprende una cápside de AAV2, y el vector comprende ITR de AAV2. En algunas realizaciones, la cápside de AAV2 comprende una proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración con respecto a VP1 de AAV2.

En algunas realizaciones de los kits anteriores, la partícula de AAV del kit se usa en combinación con uno o más agentes adicionales que aumentan la actividad de una R-espondina (por ejemplo, RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o

RSPO4). En algunas realizaciones, los kits de la invención comprenden una partícula de AAV como se describe en el presente documento y uno o más agentes adicionales que aumentan la actividad de una R-espondina (por ejemplo, RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4).

La divulgación proporciona kits adecuados para su uso en uno cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. La divulgación proporciona kits que comprenden cualquiera de las partículas de AAV recombinantes descritas en el presente documento. En algunos aspectos, los kits descritos en el presente documento comprenden además instrucciones para su uso en el tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC). En algunos aspectos, los kits descritos en el presente documento comprenden además tampones y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de administración de ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un transgén terapéutico) a la malla trabecular del ojo de un mamífero, que comprenden administrar una partícula de serotipo 2 de AAV (AAV2) que comprende un vector de rAAV al ojo del mamífero, en donde el vector de rAAV comprende el ácido nucleico, y en donde la partícula de AAV2 comprende una proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de tratamiento de un trastorno ocular en un mamífero que comprenden administrar una partícula de AAV2 que comprende un vector de rAAV al ojo del mamífero, en donde el vector de rAAV comprende ácido nucleico que codifica un transgén terapéutico, y en donde la partícula de AAV2 comprende una proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración basada en VP1 de AV2. En algunos casos, la partícula de rAAV se administra por vía intravítrea y/o intracameral. En algunos casos, la partícula de rAAV transduce células de la malla trabecular del ojo. En algunos casos, el transgén terapéutico se expresa en la malla trabecular del ojo. En algunos casos, el transgén terapéutico codifica un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico. En algunos casos, el trastorno ocular es un trastorno asociado con la malla trabecular del ojo. En algunos casos, el trastorno ocular es glaucoma de miocilina (MYOC). En algunos casos, el mamífero es un ser humano.

En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de AAV2 recombinante para administrar ácido nucleico (por ejemplo, ácido nucleico que codifica un transgén terapéutico) a la malla trabecular del ojo de un mamífero, en donde la partícula de AAV2 comprende un vector de rAAV, en donde el vector de rAAV comprende el ácido nucleico, y en donde la partícula de AAV2 comprende la proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración basada en VP1 de

AAV2. En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula de AAV2 recombinante para tratar un trastorno ocular en un mamífero, en donde la partícula de AAV2 comprende un vector de rAAV, en donde el vector de rAAV comprende ácido nucleico que codifica un transgén terapéutico, y en donde la partícula de AAV2 comprende una proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la partícula de rAAV transduce células de la malla trabecular del ojo. En algunos casos, el transgén terapéutico se expresa en la malla trabecular del ojo. En algunos casos, el transgén terapéutico codifica un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico. En algunos casos, el trastorno ocular es un trastorno asociado con la malla trabecular del ojo. En algunos casos, el trastorno ocular es glaucoma de miocilina (MYOC). En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano.

En algunos casos, la divulgación proporciona usos de una partícula de AAV2 recombinante para administrar ácido nucleico (por ejemplo, ácido nucleico que codifica un transgén terapéutico) a la malla trabecular del ojo de un mamífero, en donde la partícula de AAV2 comprende un vector de rAAV, en donde el vector de rAAV comprende el ácido nucleico, y en donde la partícula de AAV2 comprende la proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la divulgación proporciona el uso de una partícula de AAV2 recombinante para tratar un trastorno ocular en un mamífero, en donde la partícula de AAV2 comprende un vector de rAAV, en donde el vector de rAAV comprende ácido nucleico que codifica un transgén terapéutico, y en donde la partícula de AAV2 comprende una proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la partícula de rAAV se administra por vía intravítrea y/o intracameral. En algunos casos, la partícula de rAAV transduce células de la malla trabecular del ojo. En algunos casos, el transgén terapéutico se expresa en la malla trabecular del ojo. En algunos casos, el transgén terapéutico codifica un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico. En algunos casos, el trastorno ocular es un trastorno asociado con la malla trabecular del ojo. En algunos casos, el trastorno ocular es glaucoma de miocilina (MYOC). En algunos casos, el mamífero es un ser humano.

En algunos casos, la divulgación proporciona kits que administran ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un transgén terapéutico) a la malla trabecular del ojo de un mamífero, que comprenden una partícula de rAAV2 que comprende un vector de rAAV, en donde el vector de rAAV comprende el ácido nucleico, y en donde la partícula de AAV2 comprende una proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la divulgación proporciona kits para tratar un trastorno ocular en un mamífero que comprende una partícula de rAAV2 que comprende un vector de rAAV, en donde el vector de rAAV comprende ácido nucleico que codifica un transgén terapéutico, y en donde la partícula

de AAV2 comprende una proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la partícula de rAAV se administra por vía intravítrea y/o intracameral. En algunos casos, la partícula de rAAV transduce células de la malla trabecular del ojo. En algunos casos, el transgén terapéutico se expresa en la malla trabecular del ojo. En algunos casos, el transgén terapéutico codifica un polipéptido terapéutico o un ácido nucleico terapéutico. En algunos casos, el trastorno ocular es un trastorno asociado con la malla trabecular del ojo. En algunos casos, el trastorno ocular es glaucoma de miocilina (MYOC). En algunos casos, el mamífero es un ser humano.

Breve descripción de los dibujos

La **FIG. 1** demuestra que los mutantes de MYOC P370L e Y437H no se secretan y bloquean la secreción de MYOC natural ("wtMYOC"). El medio de cultivo celular o los lisados celulares de células 293 transfectadas con construcciones que expresan wtMYOC y/o mutantes de MYOC (tal como se marcaron) se sondaron mediante transferencia Western usando anticuerpo anti-MYOC humana.

La **FIG. 2** muestra que el mutante de MYOC P370L no se secreta y bloquea la secreción de MYOC natural ("wtMYOC") en células de la malla trabecular humanas transformadas con antígeno T ("hTM-T") tanto en 293T como en SV40. El medio de cultivo celular o los lisados celulares de células 293T o hTM-T transfectadas con construcciones que expresan wtMYOC y/o MYOC P370L (tal como se marcaron) se sondaron mediante transferencia de Western usando anticuerpo anti-MYOC humana.

La **FIG. 3** representa el efecto de la expresión de wtMYOC, MYOC P370L o Y437H sobre la señalización de Wnt. Para cada experimento, la barra "sin mWnt3a" está a la izquierda, y la barra "con mWnt3a - 400 ng/ml" está a la derecha.

La **FIG. 4** muestra que la expresión de RSPO3 puede restaurar la señalización de Wnt tras la coexpresión con MYOC P370L o Y437H. Para cada experimento, la barra "sin mWnt3a" está a la izquierda, y la barra "mWnt3a - 400 ng/ml" está a la derecha.

La **FIG. 5** muestra que la expresión de RSPO3 puede restaurar la señalización de Wnt en células hTM-T tras la coexpresión con MYOC P370L. Para cada experimento, la barra "sin mWnt3a" está a la izquierda, y la barra "400 ng/ml de hWnt3a" está a la derecha.

La **FIG. 6** muestra el efecto del ARNhc de MYOC sobre la expresión de MYOC en células 293T. El medio de cultivo celular o los lisados celulares de células 293T se sondaron mediante transferencia Western con anticuerpo anti-MYOC humana. Las células se transfectaron con plásmidos que expresaban wtMYOC (carril 1); wtMYOC y ARNhc de MYOC n.º 79 (2); wtMYOC y ARNhc de MYOC n.º 93 (3); wtMYOC y control de ARNhc mezclados (4); o EGFP (5). Las bandas de 55/57 kD representan formas glucosiladas (57 kD) y no glucosiladas (55 kD) de una proteína MYOC de tamaño completo. La banda de 22 kD representa el extremo N de un producto de escisión de calpaina II.

La **FIG. 7** muestra el efecto del ARNhc de MYOC sobre la expresión de MYOC en células hTM-T. El medio de cultivo celular o los lisados celulares de células hTM-T se sondaron mediante transferencia Western con anticuerpo anti-MYOC humana. Las células se transfectaron con plásmidos que expresan wtMYOC (carril 1); MYOC P370L (2); wtMYOC y P370L MYOC (3); wtMYOC y MYOC P370L y ARNhc de Grp94 n.º 1 (4); wtMYOC y MYOC P370L y ARNhc de Grp94 n.º 2 (5); wtMYOC y MYOC P370L y ARNhc de MYOC n.º 53 (6); wtMYOC y MYOC P370L y ARNhc de MYOC pGIPZ n.º 79 (7); wtMYOC y MYOC P370L y ARNhc de MYOC pGIPZ n.º 93 (8); wtMYOC y MYOC P370L y control de ARNhc mezclados (9); o EGFP (10).

La **FIG. 8** muestra que la expresión de RSPO3 y el silenciamiento de MYOC restauran sinérgicamente la señalización de Wnt tras la coexpresión con MYOC P370L. Las células 293T se cotransfectaron con la construcción indicadora TOP-Flash y wtMYOC ("MYOC"), más MYOC P370L, ARNhc de Grp94, ARNhc de MYOC pGIPZ n.º 79 (el primero) y n.º 93 (el segundo), y/o plásmidos de RSPO3, tal como se marcaron. La señalización de Wnt se amplificó después de la adición de Wnt3a de ratón recombinante (400 ng/ml) y se midió mediante ensayo TOP-Flash. La actividad luciferasa (media $\pm$ DE, n = 1-3 pocillos duplicados) se midió después de la transfección y se normalizó al control de transfección del nivel de luciferasa *Renilla* expresado constitutivamente. Para cada experimento, la barra "sin Wnt añadido" está a la izquierda, y la barra "400 ng/ml de Wnt3a añadido" está a la derecha.

La **FIG. 9** muestra que el silenciamiento de MYOC restaura la señalización de Wnt tras la coexpresión con MYOC P370L o Y437H. Las células 293T se cotransfectaron con la construcción indicadora TOP-Flash y wtMYOC ("MYOC"), más MYOC P370L, MYOC Y437H, ARNhc de MYOC y/o ARNhc de control mezclados ("pGIPZ-nulo"), tal como se marcaron. La señalización de Wnt se amplificó después de la adición de Wnt3a de ratón recombinante (400 ng/ml) y se midió mediante ensayo TOP-Flash. La actividad luciferasa (media $\pm$ DE, n = 1-3 pocillos duplicados) se midió después de la transfección y se normalizó

al control de transfección del nivel de luciferasa *Renilla* expresado constitutivamente. Para cada experimento, la barra "sin Wnt añadido" está a la izquierda, y la barra "400 ng/ml de Wnt3a añadido" está a la derecha.

5 La **FIG. 10** muestra la transducción *in vitro* (paneles izquierdos) e *in vivo* (paneles derecho) de células de la malla trabecular mediante partículas víricas de AAV2 natural (paneles superiores) y partículas de AAV2 que comprenden una sustitución de aminoácido R471A de la proteína de la cápside.

10 La **FIG. 11** muestra un diagrama de dominios de proteínas de la familia RSPO humana que representan dominios ricos en Cys similares a furina, el dominio de trombospondina tipo 1 y el dominio cargado positivamente carboxiterminal, tal como se marcaron (figura adaptada de Kim, K.A. et al. (2008) Mol. Biol. Cell. 19:2588-2596).

15 La **FIG. 12** muestra un diagrama de dominios de genes de la familia RSPO humana que representan los dominios de proteína enumerados en la **FIG. 11**. Se representa la numeración de la secuencia de aminoácidos, y los mutantes truncados probados para cada miembro de la familia son tal como se marcaron (figura adaptada de Kim, K.A. et al. (2006) Cell Cycle 5:23-26).

20 La **FIG. 13A** muestra la secuencia de RSPO3 humana de longitud completa (SEQ ID NO: 1) con los dominios de secuencia señal, FU1, FU2 y TSP1, marcados.

25 La **FIG. 13B** muestra la secuencia de un fragmento RSPO3 humano activo (SEQ ID NO: 16) con los dominios de secuencia señal, FU1 y FU2, marcados. El fragmento usado, que carece del péptido señal, corresponde a los aminoácidos 22-146 de SEQ ID NO: 16, y es 15 kDa incluyendo la marca His.

La **FIG. 13C** representa la estructura del dominio de hRSPO3 de longitud completa con los dominios de péptido señalizador, FU1, FU2, TSP1 y BR, marcados. Las posibles funciones para cada dominio se enumeran a continuación.

30 La **FIG. 13D** muestra una transferencia Western de hRSPO3 de longitud completa y el fragmento de hRSPO3.

35 La **FIG. 14** representa los fragmentos de hRSPO3 probados. La estructura del dominio de hRSPO3 de longitud completa con los dominios de péptido señalizador, FU1, FU2, TSP1 y BR, marcados y posibles funciones para cada dominio también se proporcionan a continuación.

La **FIG. 15** muestra que la expresión de fragmentos RSPO3 y RSPO3 de longitud completa puede restaurar la señalización de Wnt tras la coexpresión con MYOC Y437H.

40 La **FIG. 16** muestra que la expresión de miembros de la familia RSPO puede inducir la señalización de Wnt tras la coexpresión con MYOC Y437H incluso sin la adición de Wnt3a.

DESCRIPCIÓN DETALLADA ADICIONAL

45 La presente divulgación proporciona métodos de tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, que comprenden administrar al ojo del mamífero una partícula vírica de virus adenoasociado recombinante (rAAV). En algunos casos, la señalización de wnt en el ojo del mamífero aumenta; por ejemplo, mediante la expresión de R-espondina 1 (RSPO1), R-espondina 2 (RSPO2), R-espondina 3 (RSPO3) y/o R-espondina 4 (RSPO4). En algunos casos, se inhibe la expresión de miocilina (MYOC) (por ejemplo, miocilina mutante); por ejemplo, mediante el uso de iARN que se dirige a la expresión de MYOC. En algunos casos, la partícula de AAV comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4, y/o una variante funcional en las mismas. De acuerdo con la invención, la partícula de AAV comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2 o RSPO4. En otros casos, la partícula de rAAV comprende un vector que codifica una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) que se dirige a la expresión de una miocilina (MYOC) en el mamífero. En otros casos, la divulgación proporciona métodos de tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, que comprenden administrar al ojo del mamífero una mezcla de partículas de rAAV que comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4, y/o una variante funcional en las mismas, y partículas de rAAV que comprenden un vector que codifica una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) que se dirige a la expresión de una miocilina en el mamífero. En otros casos, la divulgación proporciona métodos de tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, que comprenden administrar al ojo del mamífero una partícula de rAAV que comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4, y/o una variante funcional en las mismas, y que codifica una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) que se dirige a la expresión de una miocilina (ARNhc de MYOC) en el mamífero. La divulgación también proporciona composiciones y kits para el tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC) usando los vectores de rAAV que codifican RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4, y/o una variante funcional en las mismas y/o iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc). La divulgación también proporciona partículas, composiciones y kits de AAV recombinante.

En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de direccionamiento de AAV2 para transducir células de la malla trabecular. En algunos casos, la divulgación proporciona partículas de rAAV2 que comprenden una mutación R471A, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunos casos, la divulgación proporciona métodos y composiciones para tratar enfermedades oculares asociadas con la malla trabecular (por ejemplo, glaucoma de miocilina (MYOC)) usando partículas víricas de AAV2 que comprenden proteína de la cápside mutada (por ejemplo, una sustitución de aminoácido R471A).

I. Técnicas generales

Las técnicas y procedimientos descritos o mencionados en este documento en general están bien comprendidos y se emplean normalmente usando metodología convencional por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, las metodologías utilizadas ampliamente descritas en Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook *et al.*, 4.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, *et al.* eds., 2003); la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames y G.R. Taylor eds., 1995); Antibodies, A Laboratory Manual (Harlow y Lane, eds., 1988); Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I. Freshney, 6.^a ed., J. Wiley and Sons, 2010); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., Academic Press, 1998); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather y P.E. Roberts, Plenum Press, 1998); Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, y D.G. Newell, eds., J. Wiley and Sons, 1993-8); Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir y C.C. Blackwell, eds., 1996); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller y M.P. Calos, eds., 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis *et al.*, eds., 1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan *et al.*, eds., 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds., J. Wiley and Sons, 2002); Immunobiology (C.A. Janeway *et al.*, 2004); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd y C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow y D. Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); y Cancer: Principles and Practice of Oncology (V.T. DeVita *et al.*, eds., J.B. Lippincott Company, 2011).

II. Definiciones

Un "vector", como se usa en este documento, se refiere a un plásmido o virus recombinante que comprende un ácido nucleico a suministrar a una célula hospedadora, *in vitro* o *in vivo*.

El término "polinucleótido" o "ácido nucleico", como se usa en este documento, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por tanto, este término incluye, aunque sin limitación, ADN o ARN mono-, bi- o multicaténario, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas química o bioquímicamente, no naturales o derivatizadas. La cadena principal del ácido nucleico puede comprender azúcares y grupos fosfato (como se puede encontrar normalmente en ARN o ADN), o grupos de azúcar o fosfato modificados o sustituidos.

Como alternativa, la cadena principal del ácido nucleico puede comprender un polímero de subunidades sintéticas tales como fosforamidatos y, por tanto, puede ser un fosforamidato de oligodesoxinucleósido (P-NH₂) o un oligómero fosforamidato-fosfodiéster mixto. Además, puede obtenerse un ácido nucleico bicaténario a partir del producto polinucleotídico monocaténario de síntesis química, sintetizando la hebra complementaria e hibridando las hebras en condiciones apropiadas o sintetizando la hebra complementaria *de novo* usando una ADN polimerasa con un cebador apropiado.

Los términos "polipéptido" y "proteína" se usan indistintamente para referirse a un polímero de residuos aminoácidos, y no están limitados a una longitud mínima. Dichos polímeros de residuos aminoácidos pueden contener residuos aminoácidos naturales o no naturales, e incluyen, aunque sin limitación, péptidos, oligopéptidos, dímeros, trímeros y multímeros de residuos aminoácidos. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas están englobados por la definición. Las expresiones también incluyen modificaciones tras la expresión del polipéptido, por ejemplo, glucosilación, sialilación, acetilación, fosforilación y similares. Además, para los propósitos de la presente invención, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como eliminaciones, adicionales y sustituciones (en general de naturaleza conservadora), en la secuencia natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, como a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como través de mutaciones de hospedadores que producen las proteínas o errores debidos a amplificación por PCR.

Un "vector vírico recombinante" se refiere a un vector polinucleotídico recombinante que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencia de ácido nucleico que no es de origen vírico). En el caso de vectores

de AAV recombinantes, el ácido nucleico recombinante está flanqueado por al menos una, preferiblemente dos, secuencias de repetición terminal invertida (ITR).

Un "vector de AAV recombinante (vector de rAAV)" se refiere a un vector polinucleotídico que comprende una o más secuencias heterólogas (es decir, secuencia de ácido nucleico que no es de origen de AAV) que están flanqueadas por al menos una, preferiblemente dos, secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV. Dichos vectores de rAAV pueden replicarse y encapsidarse en partículas víricas infecciosas cuando están presentes en una célula hospedadora que se ha infectado con un virus auxiliar adecuado (o que está expresando funciones auxiliares adecuadas) y que está expresando los productos génicos rep y cap de AAV (es decir, las proteínas Rep y Cap de AAV). Cuando se incorpora un vector rAAV en un polinucleótido más grande (por ejemplo, en un cromosoma o en otro vector tal como un plásmido usado para clonación o transfección), entonces el vector rAAV puede denominarse "provector" que puede "rescatarse" mediante replicación y encapsidación en presencia de funciones de empaquetamiento de AAV y funciones auxiliares adecuadas. Un vector rAAV puede estar en cualquiera de varias formas, incluyendo, aunque sin limitación, plásmidos, cromosomas artificiales lineales, en complejo con lípidos, encapsulados dentro de liposomas y, en realizaciones, encapsulados en una partícula vírica, particularmente una partícula de AAV. Un vector rAAV puede empaquetarse en una cápside de virus AAV para generar una "partícula vírica adenoasociada recombinante (partícula de rAAV)". Pueden proporcionarse funciones auxiliares de AAV (es decir, funciones que permiten que una célula hospedadora replique y encapside el AAV) en cualquiera de varias formas que incluyen, pero no se limitan a, un virus auxiliar o genes de virus auxiliar que ayudan en la replicación y encapsidación de AAV. En la técnica se conocen otras funciones auxiliares de AAV.

Un "virus rAAV" o "partícula vírica rAAV" se refiere a una partícula vírica compuesta por al menos una proteína de la cápside de AAV y un genoma de vector rAAV encapsidado.

"Heterólogo" significa derivado de una entidad genotípicamente distinta de la del resto de la entidad con la que se compara o en la que se introduce o incorpora. Por ejemplo, un ácido nucleico introducido por técnicas de genomanipulación en un tipo de célula diferente es un ácido nucleico heterólogo (y, cuando se expresa, puede codificar un polipéptido heterólogo). Asimismo, una secuencia celular (por ejemplo, un gen o parte del mismo) que se incorpora en un vector vírico es una secuencia de nucleótidos heteróloga con respecto al vector.

El término "transgén" se refiere a un ácido nucleico que se introduce en una célula y puede transcribirse en ARN y, opcionalmente, traducirse y/o expresarse en condiciones apropiadas. En aspectos, confiere una propiedad deseada a una célula en la que se introdujo, o da lugar de otro modo a un resultado terapéutico o de diagnóstico deseado. En otro aspecto, puede transcribirse en una molécula que media la interferencia de ARN, tal como ARNip.

Las expresiones "partículas genómicas (gp)", "equivalentes genómicos" o "copias de genoma", como se usan en referencia a una concentración vírica, se refieren al número de viriones que contiene el genoma de ADN de AAV recombinante, independientemente de la infectividad o funcionalidad. El número de partículas genómicas en un preparado de vector particular se puede medir mediante procedimientos, tales como los descritos en los Ejemplos en el presente documento o, por ejemplo, en Clark et al (1999) Hum. Gene Ther., 10: 1031-1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6:272-278.

Las expresiones "unidad de infección (iu)", "partícula infecciosa" o "unidad de replicación", como se usan en referencia a una concentración vírica, se refieren al número de partículas de vector de AAV recombinante infecciosas y competentes en la replicación, como se mide por el ensayo del centro infeccioso, también conocido como ensayo de centro de replicación, como se describe, por ejemplo, en McLaughlin et al. (1988) J. Virol., 62:1963-1973.

La expresión "unidad de transducción (tu)", como se usa en referencia a una concentración vírica, se refiere al número de partículas de vector de AAV recombinante infeccioso que provocan la producción de un producto transgénico funcional, como se mide en ensayos funcionales, tales como los descritos en los Ejemplos del presente documento o, por ejemplo, en Xiao et al. (1997) Exp. Neurobiol., 144:113-124; o en Fisher et al. (1996) J. Virol., 70:520-532 (ensayo de LFU).

Una secuencia de "repetición terminal invertida" o "ITR" es una expresión bien entendida en la técnica y se refiere a secuencias relativamente cortas encontradas en los extremos de los genomas víricos que están en orientación opuesta.

Una secuencia de "repetición terminal invertida (ITR) de AAV", una expresión bien entendida en la técnica, es una secuencia de aproximadamente 145 nucleótidos que está presente en ambos extremos del genoma de AAV monocatenario natural. Los 125 nucleótidos más externos de la ITR pueden estar presentes en cualquiera de dos orientaciones alternativas, lo que da lugar a heterogeneidad entre diferentes genomas de AAV y entre los dos extremos de un solo genoma de AAV. Los 125 nucleótidos más externos también contienen varias regiones más cortas de autocomplementariedad (denominadas regiones A, A', B, B', C, C' y D), lo que permite que se produzca un emparejamiento de bases intracatenario dentro de esta parte de la ITR.

Una "secuencia de resolución terminal" o "trs" es una secuencia en la región D de la ITR de AAV que se escinde por proteínas rep de AAV durante la replicación del ADN vírico. Una secuencia de resolución terminal mutante es resistente a la escisión por proteínas rep de AAV.

Un "virus auxiliar" para AAV se refiere a un virus que permite que AAV (que es un parvovirus defectuoso) se replique y empaquete por una célula hospedadora. Se han identificado varios de dichos virus auxiliares, incluyendo adenovirus, herpesvirus y poxvirus, tales como el virus de la varicelovacuina. Los adenovirus abarcan varios subgrupos diferentes, aunque el adenovirus de tipo 5 del subgrupo C (Ad5) es el usado más habitualmente. Se conocen numerosos adenovirus de origen humano, mamífero no humano y aviar y están disponibles de depósitos tales como la ATCC. Los virus de la familia del herpes, que también están disponibles de depósitos tales como ATCC incluyen, por ejemplo, los virus del herpes simple (VHS), los virus de Epstein-Barr (VEB), los citomegalovirus (CMV) y los virus de la seudorrabia (VPR).

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a un polipéptido o secuencia de ácido nucleico de referencia se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos o nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoacídicos o nucleótidos en el polipéptido o secuencia de ácido nucleico de referencia, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos o ácido nucleico puede conseguirse de diversas maneras que pertenecen a las habilidades de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles al público, por ejemplo, los descritos en Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel *et al.*, eds., 1987), Sup. 30, sección 7.7.18, tabla 7.7.1, y que incluye BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Un programa de alineación preferido es ALIGN Plus (Scientific and Educational Software, Pensilvania). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se estén comparando. Para los propósitos de este documento, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que puede expresarse alternativamente como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue: 100 por la fracción X/Y, donde X es el número de residuos aminoacídicos valorados como coincidencias idénticas mediante el programa de alineación de secuencias en la alineación de A y B de ese programa, y donde Y es el número total de residuos aminoacídicos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. Para los propósitos de este documento, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico dada C con respecto a, con o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada (que puede expresarse alternativamente como una secuencia de ácido nucleico C dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de ácido nucleico con respecto a, con o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada) se calcula como sigue: 100 por la fracción W/Z, donde W es el número de nucleótidos valorados como coincidencias idénticas mediante el programa de alineamiento de secuencias en el alineamiento de C y D de ese programa, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C con respecto a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D con respecto a C.

Una molécula (por ejemplo, ácido nucleico o proteína) o célula "aislada" significa que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural.

Una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos (por ejemplo, mejora de los síntomas, consecución de criterios de valoración clínicos y similares). Una cantidad eficaz puede administrarse en una o más administraciones. En términos de una patología, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para mejorar, estabilizar o retardar el desarrollo de una enfermedad. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una partícula de rAAV expresa una cantidad deseada de ácido nucleico heterólogo, tal como un polipéptido terapéutico o ácido nucleico terapéutico.

Un "individuo" o "sujeto" es un mamífero. Los mamíferos incluyen, aunque sin limitación, animales domesticados (por ejemplo, vacas, ovejas, gatos, perros y caballos), primates (por ejemplo, seres humanos y primates no humanos tales como monos), conejos y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En determinadas realizaciones, el individuo o sujeto es un ser humano.

Como se usa en este documento, "tratamiento" es una estrategia para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los propósitos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, el alivio de síntomas, la disminución del alcance de la enfermedad, estado estabilizado (por ejemplo, sin empeoramiento) de la enfermedad, prevención de la propagación (por ejemplo, metástasis) de la enfermedad, retardo o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o paliación de la patología y remisión (ya sea

parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

La expresión "malla trabecular", como se usa en el presente documento, se refiere a un tejido similar a una esponja situado cerca de la córnea y el iris que funciona para drenar el humor acuoso del ojo hacia la sangre. Un tejido similar a una esponja situado cerca de la córnea y el iris que funciona para drenar el humor acuoso del ojo hacia la sangre. La malla trabecular contiene espacios revestidos de endotelio (los espacios intertrabeculares) a través de los cuales pasa el humor acuoso al canal de Schlemm. Normalmente se divide en dos partes: la malla esclerocorneal que está en contacto con la córnea y la esclerótica y se abre al canal de Schlemm y la malla uveal que se enfrenta a la cámara anterior.

El término "retina central", como se usa en el presente documento, se refiere a la mácula externa y/o mácula interna y/o la fovea. La expresión "tipos de células de la retina central", como se usa en el presente documento, se refiere a tipos celulares de la retina central, tales como, por ejemplo, células RPE y fotorreceptoras.

El término "mácula" se refiere a la región de la retina central en primates que contiene una mayor concentración relativa de células fotorreceptoras, específicamente varillas y conos, en comparación con la retina periférica. La expresión "mácula externa", como se usa en el presente documento, también puede denominarse "mácula periférica". La expresión "mácula interna", como se usa en el presente documento, también puede denominarse "mácula central".

El término "fovea" se refiere a una región pequeña en la retina central de primates de aproximadamente igual o menor de 0,5 mm de diámetro que contiene una concentración relativa más alta de células fotorreceptoras, específicamente conos, cuando se compara con la retina periférica y la mácula.

La expresión "espacio subretiniano", como se usa en el presente documento, se refiere a la ubicación en la retina entre las células fotorreceptoras y las células del epitelio pigmentario de la retina. El espacio subretiniano puede ser un espacio potencial, tal como antes de cualquier inyección subretiniana de fluido. El espacio subretiniano también puede contener un fluido que se inyecta en el espacio potencial. En este caso, el fluido está "en contacto con el espacio subretiniano". Las células que están "en contacto con el espacio subretiniano" incluyen las células que limitan el espacio subretiniano, tales como células RPE y fotorreceptoras.

El término "ampolla", como se usa en el presente documento, se refiere a un espacio de fluido dentro del espacio subretiniano de un ojo. Una ampolla de la divulgación se puede crear mediante una única inyección de fluido en un único espacio, mediante múltiples inyecciones de uno o más fluidos en el mismo espacio, o mediante múltiples inyecciones en múltiples espacios, que cuando se reposicionan crean un espacio de fluido total útil para lograr un efecto terapéutico sobre la porción deseada del espacio subretiniano.

"Promotor de β -actina de pollo (CBA)" se refiere a una secuencia polinucleotídica derivada de un gen de β -actina de pollo (por ejemplo, beta actina de *Gallus gallus*, representada por GenBank Entrez Gene ID 396526). Como se usa en este documento, "promotor de β -actina de pollo" se puede referir a un promotor que contiene un elemento potenciador temprano de citomegalovirus (CMV), el promotor y el primer exón e intrón del gen de β -actina de pollo, y el aceptador de empalme del gen de beta-globina de conejo, tal como las secuencias descritas en Miyazaki, J., et al. (1989) Gene 79(2):269-77. Como se usa en este documento, la expresión "promotor de CAG" puede usarse indistintamente. Como se usa en este documento, la expresión "potenciador temprano de CMV/promotor de beta actina de pollo (CAG)" puede usarse indistintamente.

"Miocilina (MYOC)" se refiere a una proteína (o gen que codifica dicha proteína) implicada en la función citoesquelética, adherencia celular, señalización celular y migración celular, también conocida como respuesta glucocorticoide inducible en malla trabecular, GPOA, TIGR, GLC1A, JOAG y JOAG1. La miocilina se expresa como una proteína secretada en muchos tipos celulares diferentes. En el ojo, se cree que la miocilina es secretada en el humor acuoso por la malla trabecular, un tejido que es crítico en la regulación de la presión intraocular (PIO). Como se ha descrito anteriormente, se cree que las mutaciones en la miocilina explican un subconjunto de casos primarios de glaucoma de ángulo abierto, particularmente la forma juvenil del trastorno.

Como se usa en el presente documento, "miocilina" se puede referir a un precursor de longitud completa, así como a cualquier forma procesada de la proteína (por ejemplo, una proteína madura secretada a partir de una célula). Los ejemplos de proteínas de miocilina pueden incluir, sin limitación, miocilina humana, de ratón, de perro y de gato, por ejemplo,

secuencias de referencia del NCBI NP_000252, NP_034995, NP_001041495 y NP_001265779. Los ejemplos de genes de miocilina pueden incluir, sin limitación, genes de miocilina humana, de ratón, de perro y de gato, por ejemplo, GenBank Entrez Gene ID 4653 (*MYOC*, también conocido como *GPOA*, *JOAG*, *TIGR*, *GLC1A* y *JOAG1*), GenBank Entrez Gene ID 17926 (*Myoc*, también conocido como *TIGR*, *GLC1A* y *A1957332*), GenBank Entrez Gene ID 490344 y GenBank Entrez Gene ID 101087632.

"R-espondina 1 (RSPO1)" se refiere a un miembro de la familia R-espondina implicado en la modulación de la señalización de Wnt. El término "RSPO1" se puede referir a una proteína RSPO1 o un gen que codifica una proteína RSPO1. Los miembros de una superfamilia de proteínas que contienen repetición de trombospondina de tipo 1 (TSR-1), las R-espondinas incluyen un péptido señal, un dominio TSR-1 y dos repeticiones similares a furina. Aunque el mecanismo exacto no está claro, se cree que los polipéptidos de la familia de la R-espondina activan la señalización de Wnt. Para una descripción adicional de las conexiones entre R-espondinas y la señalización de Wnt, véase, por ejemplo, Kim, K.A. et al (2006) *Cell Cycle* 5:23-26; Kim, K.A. et al. (2008) *Mol. Biol. Cell.* 19:2588-2596; Jin, Y.R. y Yoon, J.K. (2012) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:2278-2287; y de Lau, W.B., et al. (2012) *Genome Biol.* 13(3):242.

Como se usa en el presente documento, "RSPO1" se puede referir a un precursor de longitud completa, así como a cualquier forma procesada de la proteína (por ejemplo, una proteína madura secretada a partir de una célula). Los ejemplos de proteínas RSPO1 pueden incluir, sin limitación, RSPO1 humana, de ratón, de perro y de gato, por ejemplo, secuencias de referencia del NCBI NP_001229837, NP_619624, XP_00562890 y XP_003989918. Los ejemplos de genes RSPO1 pueden incluir, sin limitación, genes RSPO1 humano, de ratón, de perro y de gato, por ejemplo, GenBank Entrez Gene ID 284654 (*RSPO1*, también conocido como *RSPO* y *CRISTIN3*), GenBank Entrez Gene ID 192199 (*Rspo1*, también conocido como *Rspodin* y *R-spondin*), GenBank Entrez Gene ID 608179 y GenBank Entrez Gene ID 101091033. En algunas realizaciones, RSPO1 es una variante funcional de una RSPO1. En algunas realizaciones, una variante funcional de RSPO1 puede incluir una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos (por ejemplo, truncamientos), pero conservar parte o toda la actividad con respecto a una o más actividades de la RSPO1 de longitud completa (por ejemplo, actividad de señalización de Wnt, ensayos para los que se describen y/o ejemplifican en el presente documento). En algunas realizaciones, la variante funcional de RSPO1 es una RSPO1 truncada. Los ejemplos de polipéptidos RSPO1 truncados incluyen, sin limitación, SEQ ID NO: 11 y 12, o formas procesadas de SEQ ID NO: 11 y 12 que carecen del péptido señalizador.

"R-espondina 2 (RSPO2)" se refiere a un miembro de la familia R-espondina implicado en la modulación de la señalización de Wnt. El término "RSPO2" se puede referir a una proteína RSPO2 o un gen que codifica una proteína RSPO2. Los miembros de una superfamilia de proteínas que contienen repetición de trombospondina de tipo 1 (TSR-1), las R-espondinas incluyen un péptido señal, un dominio TSR-1 y dos repeticiones similares a furina. Aunque el mecanismo exacto no está claro, se cree que los polipéptidos de la familia de la R-espondina activan la señalización de Wnt. Para una descripción adicional de las conexiones entre R-espondinas y la señalización de Wnt, véase, por ejemplo, Kim, K.A. et al (2006) *Cell Cycle* 5:23-26; Kim, K.A. et al. (2008) *Mol. Biol. Cell.* 19:2588-2596; Jin, Y.R. y Yoon, J.K. (2012) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:2278-2287; y de Lau, W.B., et al. (2012) *Genome Biol.* 13(3):242.

Como se usa en el presente documento, "RSPO2" se puede referir a un precursor de longitud completa, así como a cualquier forma procesada de la proteína (por ejemplo, una proteína madura secretada a partir de una célula). Los ejemplos de proteínas RSPO2 pueden incluir, sin limitación, RSPO2 humana, de ratón, de perro y de gato, por ejemplo, secuencias de referencia del NCBI NP_848660, NP_766403, XP_005627927 y XP_004000104. Los ejemplos de genes RSPO2 pueden incluir, sin limitación, genes RSPO2 humano, de ratón, de perro y de gato, por ejemplo, GenBank Entrez Gene ID 340419 (*RSPO2*, también conocido como *CRISTIN2*), GenBank Entrez Gene ID 239405 (*Rspo2*, también conocido como *.ftls*, *AA673245*, *D430027K22* y *2610028F08Rik*), GenBank Entrez Gene ID 482004 y GenBank Entrez Gene ID 101087380. En algunas realizaciones, RSPO2 es una variante funcional de una RSPO2. En algunas realizaciones, una variante funcional de RSPO2 puede incluir una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos (por ejemplo, truncamientos), pero conservar parte o toda la actividad con respecto a una o más actividades de la RSPO2 de longitud completa (por ejemplo, actividad de señalización de Wnt, ensayos para los que se describen y/o ejemplifican en el presente documento). En algunas realizaciones, la variante funcional de RSPO2 es una RSPO2 truncada. Los ejemplos de polipéptidos RSPO2 truncados incluyen, sin limitación, SEQ ID NO: 13 y 14, o formas procesadas de SEQ ID NO: 13 y 14 que carecen del péptido señalizador.

"R-espondina 3 (RSPO3)" se refiere a un miembro de la familia R-espondina implicado en la modulación de la señalización de Wnt. El término "RSPO3" se puede referir a una proteína RSPO3 o un gen que codifica una proteína RSPO3. Los miembros de una superfamilia de proteínas que contienen repetición de trombospondina de tipo 1 (TSR-1), las R-espondinas incluyen un péptido señal, un dominio TSR-1 y dos repeticiones similares a furina. Aunque el mecanismo exacto no está claro, se cree que RSPO3 activa la señalización de Wnt, y la pérdida de la función de RSPO3 en ratones y *Xenopus* da como resultado fenotipos de pérdida de función de Wnt (Kazanskaya, O., et al. (2008) *Development* 135:3655-64). Para una descripción adicional de las conexiones entre R-espondinas y señalización de Wnt, véase, por ejemplo, De Lau, W.B., et al. (2012) *Genome Biol.* 13(3):242.

Como se usa en el presente documento, "RSPO3" se puede referir a un precursor de longitud completa, así como a cualquier forma procesada de la proteína (por ejemplo, una proteína madura secretada a partir de una célula). Los ejemplos de proteínas RSPO3 pueden incluir, sin limitación, RSPO3 humana, de ratón, de perro y de gato, por ejemplo, secuencias de referencia del NCBI NP_116173, NP_082627, XP_005615677 y XP_003986583.

Los ejemplos de genes RSPO3 pueden incluir, sin limitación, genes RSPO3 humanos, de ratón, de perro y de gato, por ejemplo, GenBank Entrez Gene ID 84870 (*RSPO3*, también conocido como *PWTSR*, *THSD2* y *CRISTIN1*), GenBank Entrez Gene ID 72780 (*Rspo3*, también conocido como *Thsd2*, *Cristin1*, *AW742308* y *2810459H04Rik*), GenBank Entrez Gene ID 476287 y GenBank Entrez Gene ID 101085635. En algunos casos, RSPO3 es una variante funcional de una RSPO3. En algunos casos, una variante funcional de RSPO3 puede incluir una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos (por ejemplo, truncamientos), pero conservar parte o toda la actividad con respecto a una o más actividades de la RSPO3 de longitud completa (por ejemplo, actividad de señalización de Wnt, para la cual se describen y/o ejemplifican ensayos en el presente documento). En algunos casos, la variante de RSPO3 funcional es una RSPO3 truncada. Los ejemplos de polipéptidos RSPO3 truncados incluyen, sin limitación, SEQ ID NO: 15-17, o formas procesadas de SEQ ID NO: 15-17 que carecen del péptido señalizador.

"R-espondina 4 (RSPO4)" se refiere a un miembro de la familia R-espondina implicado en la modulación de la señalización de Wnt. El término "RSPO4" se puede referir a una proteína RSPO4 o un gen que codifica una proteína RSPO4. Los miembros de una superfamilia de proteínas que contienen repetición de trombospondina de tipo 1 (TSR-1), las R-espondinas incluyen un péptido señal, un dominio TSR-1 y dos repeticiones similares a furina. Aunque el mecanismo exacto no está claro, se cree que los polipéptidos de la familia de la R-espondina activan la señalización de Wnt. Para una descripción adicional de las conexiones entre R-espondinas y la señalización de Wnt, véase, por ejemplo, Kim, K.A. et al (2006) *Cell Cycle* 5:23-26; Kim, K.A. et al. (2008) *Mol. Biol. Cell.* 19:2588-2596; Jin, Y.R. y Yoon, J.K. (2012) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:2278-2287; y de Lau, W.B., et al. (2012) *Genome Biol.* 13(3):242.

Como se usa en el presente documento, "RSPO4" se puede referir a un precursor de longitud completa, así como a cualquier forma procesada de la proteína (por ejemplo, una proteína madura secretada a partir de una célula). Los ejemplos de proteínas RSPO4 pueden incluir, sin limitación, RSPO4 humana, de ratón, de perro y de gato, por ejemplo, secuencias de referencia del NCBI NP_001025042, NP_001035779, XP_542937 y XP_011279253. Los ejemplos de genes RSPO4 pueden incluir, sin limitación, genes RSPO4 humanos, de ratón, de perro y de gato, por ejemplo, GenBank Entrez Gene ID 343637 (*RSPO4*, también conocido como *CRISTIN4* y *C20orf182*), GenBank Entrez Gene ID 228770 (*Rspo4*, también conocido como *A730099F22* y *A930029K19Rik*), GenBank Entrez Gene ID 485813 y GenBank Entrez Gene ID 101091527. En algunas realizaciones, RSPO4 es una variante funcional de una RSPO4. En algunas realizaciones, una variante funcional de RSPO4 puede incluir una o más sustituciones, inserciones y/o deleciones de aminoácidos (por ejemplo, truncamientos), pero conservar parte o toda la actividad con respecto a una o más actividades de la RSPO4 de longitud completa (por ejemplo, actividad de señalización de Wnt, ensayos para los que se describen y/o ejemplifican en el presente documento). En algunas realizaciones, la variante funcional de RSPO4 es una RSPO4 truncada. Los ejemplos de polipéptidos RSPO4 truncados incluyen, sin limitación

SEQ ID NO: 18 y 19, o formas procesadas de SEQ ID NO: 18 y 19 que carecen del péptido señalizador.

Como se usa en el presente documento, la "interferencia por ARN (iARN)" es un proceso biológico en el que las moléculas de ARN inhiben la expresión génica, normalmente provocando la destrucción de moléculas de ARNm específicas. Los ejemplos de iARN incluyen ARN inhibidor pequeño (ARNip), microARN (miARN), ARN horquillado pequeño (ARNhc).

Como se usa en el presente documento, un "ARN horquillado pequeño" o "ARN horquillado corto" (ARNhc) es una molécula de ARN que hace un giro horquillado estrecho que puede usarse para silenciar la expresión génica diana; por ejemplo, mediante interferencia por ARN.

"Señalización de Wnt" se refiere a un grupo de vías de señalización celular relacionadas que están reguladas por la interacción entre una proteína Wnt y un receptor de la familia Frizzled (Fz) (para una revisión, véase, por ejemplo, Logan, C.Y. y Nusse, R. (2004) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:781-810). Estas vías han sido implicadas en una amplia gama de procesos patológicos y de desarrollo. Como se usa en el presente documento, a menos que se especifique lo contrario, la expresión "señalización de Wnt" se puede referir a parte o a la totalidad de la vía de Wnt canónica, la vía de Wnt/polaridad celular plana (PCP) y/o la vía de Wnt/calcio. Por ejemplo, en la vía de Wnt canónica, la unión de Wnt al complejo Frizzled/receptor de LRP da como resultado la modulación de la actividad de Dishevelled (DSH), axina, poliposis coli adenomatosa (APC) y glucógeno sintasa cinasa (GSK-3), inhibiendo en última instancia la degradación de la beta-catenina. La beta-catenina es entonces capaz de translocarse al núcleo y regular la transcripción génica, por ejemplo, junto con factores de transcripción del factor de unión al potenciador linfóide 1/factor de transcripción específico de linfocitos T (LEF/TCF). En algunas realizaciones, la actividad beta-catenina se puede ensayar como una lectura para la señalización de Wnt (por ejemplo, mediante un ensayo TOP-Flash, tal como el caracterizado en Molenaar, M., et al. (1996) *Cell* 86(3):391-9).

Una referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en este documento incluye (y describe) realizaciones que se refieren a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, una descripción que se refiera a "aproximadamente X" incluye una descripción de "X".

Como se usa en este documento, la forma singular de los artículos "un/o", "una" y "el/la" incluye referencias en plural salvo que se indique de otro modo.

Se entiende que los aspectos y realizaciones de la invención descritos en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste en" y/o "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones.

III. Métodos de tratamiento

La invención se refiere a la terapia génica para el glaucoma de miocilina (MYOC), en donde las partículas de rAAV que comprenden vectores terapéuticos se administran al ojo de un mamífero. La partícula de rAAV para su uso en la invención comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2 o RSPO4, en donde RSPO1, RSPO2 o RSPO4 se une operativamente a un promotor, en donde el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO4 o RSPO4 en el ojo del mamífero y/o en las células de la malla trabecular. En algunas realizaciones, el glaucoma de miocilina (MYOC) es glaucoma primario de ángulo abierto (POAG). En algunas realizaciones, el glaucoma de miocilina (MYOC) es la forma juvenil de glaucoma primario de ángulo abierto (JOAG). En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano (por ejemplo, un ser humano con POAG o un ser humano con JOAG). En algunas realizaciones, el mamífero con glaucoma de miocilina (MYOC) tiene una MYOC mutada. En algunas realizaciones, la MYOC mutada comprende una o más sustituciones de aminoácidos correspondientes a E323K, K398R, Q368X, G364V, P370L, D380A, K423E, Y437H e I477S de MYOC humana. En algunas realizaciones, el gen MYOC mutado comprende una o más sustituciones de aminoácidos correspondientes a sustituciones de aminoácidos P370L y/o Y437H de MYOC humana. En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC) en un ser humano, que comprenden administrar al ojo del ser humano una cantidad eficaz de partículas de rAAV que comprenden un vector que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas y/o iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc). La partícula de rAAV para su uso en la invención comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2 o RSPO4. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV para su uso en la invención se usa para reducir un síntoma de glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero; por ejemplo, reducir la presión intraocular, reducir la acumulación de MYOC en la malla trabecular, reducir la hipertensión ocular o aumentar el flujo de salida acuoso de la malla trabecular.

En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de mejora de la señalización de Wnt en células de la malla trabecular en un mamífero que tiene un trastorno ocular, que comprenden administrar al ojo del mamífero una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas. En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de mejora de la señalización de Wnt en células de la malla trabecular en un mamífero que tiene un trastorno ocular, que comprenden administrar al ojo del mamífero una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica una iARN de MYOC que se dirige a la expresión de una miocilina (MYOC) en el mamífero. En algunos casos, la señalización de Wnt se potencia usando una o más partículas víricas que expresan RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas y/o iARN de MYOC; por ejemplo, RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional de las mismas y la iARN de MYOC se puede expresar a partir de vectores de rAAV con diferentes genomas víricos recombinantes o del mismo genoma vírico de rAAV.

Vectores terapéuticos

La invención se refiere a terapia génica para glaucoma de miocilina (MYOC), en donde partículas de rAAV que comprenden vectores terapéuticos se administran al ojo de un mamífero; por ejemplo, el vector terapéutico puede codificar un ácido nucleico terapéutico y/o un polipéptido terapéutico. La partícula de rAAV para su uso en la invención comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2 o RSPO4. Se puede generar un vector de AAV terapéutico que codifica un ácido nucleico terapéutico y/o polipéptido terapéutico usando métodos conocidos en la técnica, usando métodos de síntesis y recombinantes estándar. En algunos casos, el polipéptido terapéutico es un polipéptido que estimula la señalización de Wnt. En algunos casos, el polipéptido terapéutico estimula la señalización de Wnt en presencia de una MYOC mutante. En algunos casos, el polipéptido terapéutico estimula la señalización de Wnt en presencia de una MYOC humana mutante asociada con glaucoma. En algunos casos, la MYOC mutante comprende una sustitución de aminoácidos P370L y/o Y437H. En algunos casos, la MYOC mutada comprende una o más sustituciones de aminoácidos correspondientes a E323K, K398R, Q368X, G364V, P370L, D380A, K423E, Y437H e I477S de MYOC humana.

En algunos casos, la divulgación proporciona vectores de rAAV para el tratamiento de glaucoma de miocilina (MYOC), en donde los vectores de rAAV codifican un polipéptido R-espondina (RSPO) (por ejemplo, RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional de las mismas). En algunas realizaciones, el polipéptido RSPO1 es una RSPO1 humana. En algunas realizaciones, la RSPO1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:8, o una variante funcional de la misma. Un ejemplo de una variante funcional de RSPO1 incluye una RSPO1 que tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la variante de RSPO1 comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de 10 sustituciones, adiciones y/o deleciones de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 mientras se mantiene la capacidad de estimular la señalización de Wnt (por ejemplo, en presencia de una

MYOC mutante). En algunas realizaciones, la variante de RSPO1 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, RSPO1 es una RSPO1 truncada. En algunas realizaciones, la RSPO1 truncada puede incluir uno o más dominios ricos en Cys similares a furina (por ejemplo, FU1 y/o FU2), pero carecer de uno o más de: un péptido señalizador, un dominio de trombospondina de tipo 1 (por ejemplo, TSR-1 o TSP1) y/o un dominio carboxiterminal cargado positivamente (por ejemplo, que incluye un dominio NLS y/o BR bipartito; para referencia, véanse las **FIG. 11-13C**). En ciertas realizaciones, la RSPO1 truncada puede comprender SEQ ID NO: 11 y/o 12, o formas procesadas de SEQ ID NO: 11 y/o 12 que carecen del péptido señalizador. En ciertas realizaciones, la RSPO1 truncada tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 11 y/o 12. En algunas realizaciones, el polipéptido RSPO2 es una RSPO2 humana. En algunas realizaciones, la RSPO2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, o una variante funcional de la misma. Un ejemplo de una variante funcional de RSPO2 incluye una RSPO2 que tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, la variante de RSPO2 comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de 10 sustituciones, adiciones y/o deleciones de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, mientras se mantiene la capacidad de estimular la señalización de Wnt (por ejemplo, en presencia de una MYOC mutante). En algunas realizaciones, la variante de RSPO2 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO:9. En algunas realizaciones, RSPO2 es una RSPO2 truncada. En algunas realizaciones, la RSPO2 truncada puede incluir uno o más dominios ricos en Cys similares a furina (por ejemplo, FU1 y/o FU2), pero carecer de uno o más de: un péptido señalizador, un dominio de trombospondina de tipo 1 (por ejemplo, TSR-1 o TSP1) y/o un dominio carboxiterminal cargado positivamente (por ejemplo, que incluye un dominio NLS y/o BR bipartito; para referencia, véanse las **FIG. 11-13C**). En ciertas realizaciones, la RSPO2 truncada puede comprender SEQ ID NO: 13 y/o 14, o formas procesadas de SEQ ID NO: 13 y/o 14 que carecen del péptido señalizador. En ciertas realizaciones, la RSPO2 truncada tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 13 y/o 14. En algunos casos, el polipéptido RSPO3 es una RSPO3 humana. En algunas realizaciones, RSPO3 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una variante funcional de la misma. Un ejemplo de una variante funcional de RSPO3 incluye una RSPO3 que tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En algunos casos, la variante de RSPO3 comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de 10 sustituciones, adiciones y/o deleciones de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 mientras se mantiene la capacidad de estimular la señalización de Wnt (por ejemplo, en presencia de una MYOC mutante). En algunos casos, la variante de RSPO3 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, RSPO3 es una RSPO3 truncada. En algunos casos, la RSPO3 truncada puede incluir uno o más dominios ricos en Cys similares a furina (por ejemplo, FU1 y/o FU2), pero carecer de uno o más de: un péptido señalizador, un dominio de trombospondina de tipo 1 (por ejemplo, TSR-1 o TSP1) y/o un dominio carboxiterminal cargado positivamente (por ejemplo, que incluye un dominio NLS y/o BR bipartito; para referencia, véanse las **FIG. 11-13C**). En ciertos casos, la RSPO3 truncada puede comprender SEQ ID NO: 15, 16 y/o 17, o formas procesadas de SEQ ID NO: 15, 16 y/o 17 que carecen del péptido señalizador. En ciertos casos, la RSPO3 truncada tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 15,

16 y/o 17. En algunas realizaciones, el polipéptido RSPO4 es una RSPO4 humana. En algunas realizaciones, la RSPO4 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9, o una variante funcional de la misma. Un ejemplo de una variante funcional de RSPO2 incluye una RSPO2 que tiene una o más sustituciones, adiciones y/o deleciones de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, la variante de RSPO4 comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de 10 sustituciones, adiciones y/o deleciones de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 a la vez que se mantiene la capacidad de estimular la señalización de Wnt (por ejemplo, en presencia de una MYOC mutante). En algunas realizaciones, la variante de RSPO4 tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, RSPO4 es una RSPO4 truncada. En algunas realizaciones, la RSPO4 truncada puede incluir uno o más dominios ricos en Cys similares a furina (por ejemplo, FU1 y/o FU2), pero carecer de uno o más de: un péptido señalizador, un dominio de trombospondina de tipo 1 (por ejemplo, TSR-1 o TSP1) y/o un dominio carboxiterminal cargado positivamente (por ejemplo, que incluye un dominio NLS y/o BR bipartito; para referencia, véanse las **FIG. 11-13C**). En ciertas realizaciones, la RSPO4 truncada puede comprender SEQ ID NO: 18 y/o 19, o formas procesadas de SEQ ID NO: 18 y 19 que carecen del péptido señalizador. En ciertas realizaciones, la RSPO4 truncada tiene más de aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con SEQ ID NO: 18 y/o 19.

En algunos casos, el vector de rAAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de la misma unida operativamente a un promotor. En algunos casos, el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o variante funcional de la misma en el ojo del mamífero. En algunos casos, el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o variante funcional de las mismas en células de la malla trabecular. En la partícula de rAAV de la invención, RSPO1, RSPO2 o RSPO4 se une operativamente a un promotor en donde el promotor es capaz de expresar el RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en el ojo

del mamífero y/o en células de la malla trabecular. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor híbrido de β -actina de pollo (CBA).

La divulgación proporciona métodos de terapia génica para glaucoma de miocilina (MYOC), en donde partículas de rAAV que comprenden vectores terapéuticos se administran al ojo de un mamífero; por ejemplo, el vector terapéutico puede codificar un ácido nucleico terapéutico y/o un polipéptido terapéutico. Se puede generar un vector de AAV terapéutico que codifica un ácido nucleico terapéutico y/o polipéptido terapéutico usando métodos conocidos en la técnica, usando métodos de síntesis y recombinantes estándar. En algunos casos, el ácido nucleico terapéutico codifica un ARN que se dirige a la expresión de MYOC. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un ARN que reduce o inhibe la expresión de MYOC. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un ARN que reduce o inhibe la expresión de un mutante

MYOC. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un ARN que reduce o inhibe la expresión de una MYOC humana mutante. En algunos casos, la MYOC humana mutante comprende una sustitución de aminoácido P370L y/o una sustitución de aminoácido Y437. Los ejemplos no limitantes de ácido nucleico terapéutico incluyen iARN, ARN inhibidor pequeño (ARNip), microARN (miARN), ARN horquillado pequeño (ARNhc) y/o ribozimas (tales como ribozimas de cabeza de martillo y horquilla). En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un ARN que reduce o inhibe la expresión de MYOC es un ARNhc que reduce o inhibe la expresión de MYOC (por ejemplo, MYOC natural y mutante).

En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de terapia génica para el glaucoma de miocilina (MYOC), en donde partículas de rAAV que comprenden vectores terapéuticos se administran al ojo de un mamífero, en donde los vectores comprenden ácido nucleico que codifica uno o más polipéptidos terapéuticos. Las partículas de rAAV que comprenden vectores terapéuticos se pueden generar usando métodos conocidos en la técnica, usando métodos de síntesis y recombinantes estándar. En algunos casos, el vector codifica un polipéptido terapéutico. En algunos casos, el polipéptido terapéutico se dirige a la señalización de Wnt. En algunos casos, el polipéptido terapéutico estimula la señalización de Wnt.

En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de terapia génica para el glaucoma de miocilina (MYOC), en donde partículas de rAAV que comprenden vectores terapéuticos se administran al ojo de un mamífero, en donde los vectores comprenden ácido nucleico que codifica uno o más polipéptidos terapéuticos y uno o más ácidos nucleicos terapéuticos. Las partículas de rAAV que comprenden vectores terapéuticos se pueden generar usando métodos conocidos en la técnica, usando métodos de síntesis y recombinantes estándar. En algunos casos, el polipéptido terapéutico se dirige a la señalización de Wnt y el ácido nucleico terapéutico se dirige a la expresión de MYOC. En algunos casos, el polipéptido terapéutico estimula la señalización de Wnt. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un ARN que reduce o inhibe la expresión de MYOC. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un ARN que reduce o inhibe la expresión de una MYOC mutante. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un ARN que reduce o inhibe la expresión de una MYOC humana mutante. En algunos casos, la MYOC humana mutante comprende una sustitución de aminoácido P370L y/o una sustitución de aminoácido Y437. Los ejemplos no limitantes de ácido nucleico terapéutico incluyen iARN, ARNip, miARN, ARNhc y/o ribozimas.

En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de terapia génica para el glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, en donde las partículas de rAAV que comprenden vectores que codifican uno o más polipéptidos terapéuticos se administran al mamífero y las partículas de rAAV que comprenden vectores que codifican uno o más ácidos nucleicos terapéuticos se administran al mamífero. En algunos casos, el polipéptido terapéutico se dirige a la señalización de Wnt y el ácido nucleico terapéutico se dirige a la expresión de MYOC. En algunos casos, el polipéptido terapéutico estimula la señalización de Wnt. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un ARN que reduce o inhibe la expresión de MYOC. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un ARN que reduce o inhibe la expresión de una MYOC mutante. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo codifica un ARN que reduce o inhibe la expresión de una MYOC humana mutante. En algunos casos, la MYOC humana mutante comprende una sustitución de aminoácido P370L y/o una sustitución de aminoácido Y437. Los ejemplos no limitantes de ácido nucleico terapéutico incluyen iARN, ARNip, miARN, ARNhc y/o ribozimas. Las partículas de rAAV que comprenden vectores que codifican uno o más polipéptidos terapéuticos y las partículas de rAAV que comprenden vectores que codifican uno o más ácidos nucleicos terapéuticos se pueden administrar al mamífero simultánea o secuencialmente. En algunos casos, las partículas de rAAV que comprenden vectores que codifican uno o más polipéptidos terapéuticos se administran antes de que se administren partículas de rAAV que comprenden vectores que codifican uno o más ácidos nucleicos terapéuticos. En algunos casos, las partículas de rAAV que comprenden vectores que codifican uno o más polipéptidos terapéuticos se administran después de que se administran partículas de rAAV que comprenden vectores que codifican uno o más ácidos nucleicos terapéuticos.

Los ácidos nucleicos de la divulgación pueden codificar polipéptidos que son proteínas intracelulares, ancladas en la membrana celular, permanecen dentro de la célula o son secretados por la célula transducida con los vectores de la invención. Para polipéptidos secretados por la célula que recibe el vector; preferiblemente el polipéptido es soluble (es decir, no unido a la célula). Por ejemplo, los polipéptidos solubles están desprovistos de una región

transmembrana y se secretan a partir de la célula. En la técnica se conocen técnicas para identificar y eliminar secuencias de ácido nucleico que codifican dominios transmembranarios.

Los vectores que se pueden administrar de acuerdo con la presente divulgación también incluyen vectores que comprenden un ácido nucleico que codifica un ARN (por ejemplo, ARNhc, iARN, ribozimas, miARN, ARNip, ARN antisentido) que, cuando se transcribe a partir de los ácidos nucleicos del vector, puede tratar glaucoma de miocilina (MYOC) interfiriendo con la traducción o transcripción de una proteína anormal o en exceso asociada con un estado patológico de la invención; por ejemplo, MYOC. En algunos ejemplos, los ácidos nucleicos de la divulgación pueden codificar un ARN que trata una enfermedad mediante la eliminación o reducción altamente específica de ARNm que codifica las proteínas anormales y/o en exceso. Las secuencias de ARN terapéutico incluyen ARN horquillado pequeño (ARNhc), iARN, ARN inhibidor pequeño

(ARNip), microARN (miARN) y/o ribozimas (tales como ribozimas de cabeza de martillo y horquilla) que pueden tratar enfermedades mediante la eliminación o reducción altamente específica de ARNm que codifica las proteínas anormales y/o en exceso, tales como las que se producen en diversas formas de degeneración retiniana heredada. Los ejemplos de secuencias de ARN terapéutico y ácidos nucleicos que codifican estas secuencias que pueden usarse en la invención incluyen las descritas, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.225.291.

En algunas realizaciones de la invención, la secuencia de ARN terapéutico es una secuencia de iARN (por ejemplo, ARNhc) que se dirige a la expresión de MYOC. En algunas realizaciones, la expresión dirigida a la secuencia de iARN (por ejemplo, ARNhc) de MYOC es una secuencia de iARN (por ejemplo, ARNhc) que reduce o inhibe la expresión de MYOC. En algunas realizaciones, la iARN (por ejemplo, ARNhc) reduce o inhibe la expresión de una MYOC humana. En algunas realizaciones, la iARN (por ejemplo, ARNhc) reduce o inhibe la expresión de una MYOC que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:3. En algunas realizaciones, la iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) se dirige a una secuencia de aminoácidos de QAMSVIH (SEQ ID NO:6) de MYOC. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV codifican un vector que comprende más de una iARN (por ejemplo, ARNhc) que se dirige (por ejemplo, reduce o inhibe) a la expresión de MYOC. En algunas realizaciones, la secuencia de bucle de la iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) comprende la secuencia de ácido nucleico AATAGTGAAGCCACAGATGTATT (SEQ ID NO:7). En algunas realizaciones, las partículas de rAAV codifican un vector que comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco o más iARN (por ejemplo, ARNhc) que se dirige (por ejemplo, reduce o inhibe) la expresión de MYOC.

En algunas realizaciones, el vector rAAV comprende ácido nucleico que codifica una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) unido operativamente a un promotor. En algunas realizaciones, el promotor es capaz de expresar la iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) en el ojo del mamífero. En algunas realizaciones, el promotor es capaz de expresar la iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) en células de la malla trabecular. En algunas realizaciones, el promotor es un promotor híbrido de β -actina de pollo (CBA). En algunas realizaciones, el promotor es un promotor de la ARN polimerasa III.

En algunos casos, el vector rAAV comprende ácido nucleico que codifica cualquier RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o variante funcional de la misma como se describe en el presente documento y ácido nucleico que codifica cualquier iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) como se describe en el presente documento. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional de las mismas, y el ácido nucleico que codifica iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) están en diferentes genomas de rAAV. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional de las mismas, y el ácido nucleico que codifica iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) están en el mismo genoma de rAAV. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional de las mismas, y el ácido nucleico que codifica iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) se unen operativamente al mismo promotor. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional de las mismas, y el ácido nucleico que codifica iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) se unen operativamente a los diferentes promotores. En algunos casos, el ácido nucleico que codifica el RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o variante funcional de las mismas es 5' respecto al ácido nucleico que codifica la iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc). En algunos casos, el ácido nucleico que codifica el RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o variante funcional de las mismas es 3' respecto al ácido nucleico que codifica la iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc). En algunos casos, el ácido nucleico que codifica RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional de las mismas, y el ácido nucleico que codifica iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) se unen operativamente al mismo promotor, en donde el ácido nucleico incluye un sitio de entrada interna al ribosoma (IRES) RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o variante funcional de las mismas, y los ácidos nucleicos de iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc).

Composiciones de rAAV

En algunas realizaciones, la divulgación proporciona composiciones que comprenden cualquiera de las partículas de rAAV descritas en el presente documento. La partícula de rAAV para su uso en la invención puede estar en una composición farmacéutica. En general, las composiciones para su uso en los métodos y sistemas de la divulgación comprenden una cantidad eficaz de partículas de rAAV que comprenden vectores de rAAV que codifican un

polipéptido y/o ARN, preferentemente en un excipiente farmacéuticamente aceptable. Como es bien conocido en la técnica, los excipientes farmacéuticamente aceptables son sustancias relativamente inertes que facilitan la administración de una sustancia farmacológicamente eficaz y se pueden suministrar como disoluciones o suspensiones líquidas, como emulsiones o como formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de su uso. Por ejemplo, un excipiente puede dar forma o consistencia, o actuar como diluyente. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, agentes estabilizantes, agentes humectantes y emulsionantes, sales para diferentes osmolaridades, agentes encapsulantes, sustancias tamponantes del pH y tampones. Dichos excipientes incluyen cualquier agente farmacéutico adecuado para la administración directa al ojo que se puede administrar sin toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sorbitol, cualquiera de los diversos compuestos de TWEEN y líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Pueden incluirse sales farmacéuticamente aceptables en el mismo, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Una discusión exhaustiva de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

En general, estas composiciones se formulan para su administración mediante inyección ocular (por ejemplo, intravítrea, intracameral, subretiniana). Por consiguiente, estas composiciones se combinan preferentemente con vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina, solución salina equilibrada de Ringer (pH 7,4) y similares. Aunque no se requieren, las composiciones pueden administrarse opcionalmente en una forma farmacéutica unitaria adecuada para la administración de una cantidad precisa.

En algunos casos, la divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas de rAAV para el tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC). En algunos casos, la formulación comprende partículas de rAAV que comprenden un vector de rAAV que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4, o una variante funcional del mismo. En algunos casos, la formulación comprende partículas de rAAV que comprenden un vector rAAV que codifica una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc). En algunos casos, la formulación comprende partículas de rAAV que comprenden un vector de rAAV que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4, o una variante funcional del mismo, y una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc). En algunos casos, la formulación comprende partículas de rAAV que comprenden un vector de rAAV que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4, o una variante funcional del mismo, y partículas de rAAV que comprenden un vector de rAAV que codifica una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc).

Métodos de administración ocular de rAAV

En algunos aspectos, la invención se refiere al tratamiento de glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, comprendiendo el método administrar partículas de rAAV al ojo del mamífero. En algunos casos divulgados en el presente documento, las partículas de rAAV comprenden un vector de rAAV que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3 y/o RSPO4, o una variante funcional del mismo, y/o un vector de rAAV que codifica una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc). En la invención, la partícula de rAAV comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2 o RSPO4. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV se administran al ojo mediante inyección intravítrea y/o intracameral. Se conocen en la técnica métodos de administración de partículas de rAAV al ojo.

En algunos casos, las partículas de rAAV que comprenden vectores de rAAV que codifican RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional de las mismas, y/o iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) se administran al ojo de un mamífero donde RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o variante funcional de las mismas, y/o iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) se expresan en la malla trabecular del ojo. En algunos casos, las partículas de rAAV que comprenden vectores de rAAV que codifican RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional de las mismas, se administran al ojo de un mamífero donde se transducen otras partes del ojo (por ejemplo, células ganglionares de la retina). El uso de partículas de rAAV que comprenden la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A puede facilitar la transducción de células de la malla trabecular.

Al transducir de manera segura y eficaz células oculares (por ejemplo, células de la malla trabecular) con un vector que comprende un polipéptido terapéutico o secuencia de ácido nucleico, los métodos de la divulgación se pueden usar para tratar a un individuo; por ejemplo, un ser humano, que tiene un glaucoma de miocilina (MYOC), en donde las células transducidas producen el polipéptido terapéutico o secuencia de ARN en una cantidad suficiente para tratar el glaucoma de miocilina (por ejemplo, POAG o JOAG). En algunas realizaciones, la transducción de células oculares se mejora usando partículas de rAAV2 que comprenden una sustitución de aminoácido R471A de proteínas de la cápside de AAV, numeración basada en VP1 de AAV2. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV demuestran una mayor transducción de células de la malla trabecular; por ejemplo, transducción de más de aproximadamente un 10%, 25%, 50%, 75%, 100% o cualquier número entre ellos de células de la malla trabecular.

Se administra una cantidad eficaz de rAAV (de acuerdo con la invención, en forma de partículas), dependiendo de los objetivos del tratamiento. Por ejemplo, cuando un porcentaje bajo de transducción puede conseguir el efecto terapéutico deseado, entonces el objetivo del tratamiento en general es satisfacer o superar este nivel de transducción. En algunos casos, este nivel de transducción puede conseguirse mediante la transducción de tan

solo aproximadamente un 1 a un 5% de las células diana (por ejemplo, células de la malla trabecular), en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 20% de las células del tipo de tejido deseado, en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 50%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 80%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 95%, en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 99% de las células del tipo de tejido deseado. Como guía, el número de partículas administradas por inyección es, en general, entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{14} partículas, entre aproximadamente 1×10^7 y 1×10^{13} partículas, entre aproximadamente 1×10^9 y 1×10^{12} partículas o aproximadamente 1×10^9 partículas, aproximadamente 1×10^{10} partículas o aproximadamente 1×10^{11} partículas. La composición de rAAV se puede administrar mediante una o más inyecciones oculares, ya sea durante el mismo procedimiento o espaciadas por días, semanas, meses o años. En algunas realizaciones, pueden usarse múltiples vectores para tratar al ser humano.

Los métodos de identificación de células oculares transducidas por partículas víricas de AAV son conocidos en la técnica; por ejemplo, puede usarse inmunohistoquímica o el uso de un marcador, tal como proteína fluorescente verde potenciada, para detectar la transducción de partículas víricas; por ejemplo, partículas víricas que comprenden una cápside de rAAV con una o más sustituciones de aminoácidos.

En algunas realizaciones de la invención, los métodos comprenden la administración intravítrea y/o intracameral de una cantidad eficaz de partículas víricas de AAV al mamífero para el tratamiento de un individuo con glaucoma de miocilina (MYOC); por ejemplo, un ser humano con POAG o JOAG. En algunas realizaciones, la composición se inyecta en una o más ubicaciones en el ojo para permitir la expresión de un ácido nucleico heterólogo en células del ojo (por ejemplo, células de la malla trabecular). En algunas realizaciones, la composición se inyecta en uno cualquiera de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez ubicaciones en el ojo.

En algunas realizaciones, las partículas víricas de rAAV que comprenden una cápside de rAAV se administran a más de una ubicación simultánea o secuencialmente. En algunas realizaciones, múltiples inyecciones de partículas víricas de rAAV no están espaciadas más de una hora, dos horas, tres horas, cuatro horas, cinco horas, seis horas, nueve horas, doce horas o 24 horas.

Métodos de administración subretiniana

Los métodos de administración subretiniana son conocidos en la técnica. Por ejemplo, véase el documento de patente WO 2009/105690. Brevemente, el método general para administrar partículas de rAAV (por ejemplo, partículas de rAAV2) a la subretina de la mácula y la fovea se puede ilustrar mediante el siguiente esquema breve. Este ejemplo pretende simplemente ilustrar ciertas características del método, y no pretende en modo alguno ser limitante.

En general, el vector rAAV se puede administrar en forma de una composición inyectada por vía intraocular (subretiniana) bajo observación directa usando un microscopio quirúrgico. En algunas realizaciones, el vector está encapsulado en una partícula de rAAV en donde la partícula de rAAV comprende una cápside de rAAV que comprende proteínas de la cápside de rAAV que comprenden una o más sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones que interactúan con un proteoglicano de sulfato de heparano (por ejemplo, reduce o inhibe o suprime la unión a HSPG), y el vector de rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo y al menos una repetición terminal invertida de AAV. Este procedimiento puede implicar vitrectomía seguida de la inyección de suspensión del vector de rAAV usando una cánula fina a través de una o más retinotomías pequeñas en el espacio subretiniano.

Brevemente, se puede suturar una cánula de infusión en su lugar para mantener un volumen de globo normal mediante infusión (por ejemplo, de solución salina) durante toda la operación. Una vitrectomía se realiza usando una cánula de tamaño de orificio apropiado (por ejemplo, de calibre 20 a 27), en donde el volumen de gel vítreo que se retira se reemplaza por infusión de solución salina u otra disolución isotónica de la cánula de infusión. La vitrectomía se realiza ventajosamente debido a que (1) la eliminación de su corteza (la membrana hialoide posterior) facilita la penetración de la retina por la cánula; (2) su eliminación y reemplazo con fluido (por ejemplo, solución salina) crea espacio para acomodar la inyección intraocular del vector, y (3) su eliminación controlada reduce la posibilidad de desgarros retinianos y desprendimiento de retina no planificado.

En algunas realizaciones, la composición de rAAV se inyecta directamente en el espacio subretiniano fuera de la retina central, utilizando una cánula del tamaño de orificio apropiado (por ejemplo, calibre 27-45), creando de este modo una ampolla en el espacio subretiniano. En otras realizaciones, la inyección subretiniana de la composición de rAAV está precedida por la inyección subretiniana de un volumen pequeño (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 ml) de un fluido apropiado (tal como solución salina o solución de Ringer) en el espacio subretiniano fuera de la retina central. Esta inyección inicial en el espacio subretiniano establece una ampolla de fluido inicial dentro del espacio subretiniano, provocando un desprendimiento de retina localizado en la ubicación de la ampolla inicial. Esta ampolla de fluido inicial puede facilitar la administración dirigida de la composición de rAAV al espacio subretiniano (definiendo el plano de inyección antes de la administración de rAAV), y minimizar la posible administración de rAAV en la coroides y la posibilidad de inyección o reflujo de rAAV en la cavidad vítrea.

En algunas realizaciones, esta ampolla de fluido inicial se puede inyectar adicionalmente con fluidos que comprenden una o más composiciones de rAAV y/o uno o más agentes terapéuticos adicionales mediante la administración de estos fluidos directamente a la ampolla de fluido inicial con la misma cánula o con cánulas de orificio fino adicionales.

La administración intraocular de las composiciones de rAAV y/o el pequeño volumen inicial de fluido se puede realizar usando una cánula de orificio fino (por ejemplo, calibre 27-45) unida a una jeringa. En algunas realizaciones, el émbolo de esta jeringa se puede accionar mediante un dispositivo mecanizado, tal como mediante la depresión de un pedal de pie. La cánula de orificio fino se hace avanzar a través de la esclerotomía, a través de la cavidad vítrea y hacia la retina en un sitio predeterminado en cada sujeto de acuerdo con el área de la retina a ser dirigida (pero fuera de la retina central). Bajo visualización directa, la suspensión del vector se inyecta mecánicamente bajo la retina neurosensorial, lo que provoca un desprendimiento de retina localizado con una retinotomía autosellante no expandible. Como se ha indicado anteriormente, la composición de rAAV puede inyectarse directamente en el espacio subretiniano creando una ampolla fuera de la retina central o el vector se puede inyectar en una ampolla inicial fuera de la retina central, haciendo que se expanda (y expandiendo el área de desprendimiento de retina). En algunas realizaciones, la inyección de la composición de rAAV va seguida de la inyección de otro fluido en la ampolla.

Sin desear ceñirse a la teoría, la tasa y la ubicación de la o las inyecciones subretinianas pueden dar como resultado fuerzas de cizallamiento localizadas que pueden dañar la mácula, la fovea y/o las células RPE subyacentes. Las inyecciones subretinianas se pueden realizar a una tasa que minimice o evite las fuerzas de cizallamiento. En algunas realizaciones, la composición de rAAV se inyecta durante aproximadamente 15-17 minutos. En algunas realizaciones, el vector se inyecta durante aproximadamente 17-20 minutos. En algunas realizaciones, la composición de rAAV se inyecta durante aproximadamente 20-22 minutos. En algunas realizaciones, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 35 a aproximadamente 65 $\mu\text{l}/\text{min}$. En algunas realizaciones, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 35 $\mu\text{l}/\text{min}$. En algunas realizaciones, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 40 $\mu\text{l}/\text{min}$. En algunas realizaciones, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 45 $\mu\text{l}/\text{min}$. En algunas

realizaciones, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 50 $\mu\text{l}/\text{min}$. En algunas realizaciones, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 55 $\mu\text{l}/\text{min}$. En algunas realizaciones, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 60 $\mu\text{l}/\text{min}$. En algunas realizaciones, la composición de rAAV se inyecta a una tasa de aproximadamente 65 $\mu\text{l}/\text{min}$. Un experto en la técnica reconocería que la tasa y el tiempo de inyección de la ampolla pueden estar dirigidos, por ejemplo, por el volumen de la composición de rAAV o el tamaño de la ampolla necesario para crear un desprendimiento de retina suficiente para acceder a las células de la retina central, el tamaño de la cánula usada para administrar la composición de rAAV y la capacidad para mantener de forma segura la posición de la cánula de la invención.

En algunas realizaciones de la invención, el volumen de la composición inyectada en el espacio subretiniano de la retina es más de aproximadamente uno cualquiera de 1 μl , 2 μl , 3 μl , 4 μl , 5 μl , 6 μl , 7 μl , 8 μl , 9 μl , 10 μl , 15 μl , 20 μl , 25 μl , 50 μl , 75 μl , 100 μl , 200 μl , 300 μl , 400 μl , 500 μl , 600 μl , 700 μl , 800 μl , 900 μl o 1 ml, o cualquier cantidad entre ellos.

Se pueden crear una o múltiples (por ejemplo, 2, 3 o más) ampollas. En general, el volumen total de ampollas o ampollas creadas por los métodos y sistemas de la invención no puede superar el volumen de fluido del ojo, por ejemplo, aproximadamente 4 ml en un sujeto humano típico. El volumen total de cada ampolla individual es preferiblemente al menos aproximadamente 0,3 ml, y más preferiblemente al menos aproximadamente 0,5 ml con el fin de facilitar un desprendimiento de retina de tamaño suficiente para exponer los tipos celulares de la retina central y crear una ampolla de dependencia suficiente para una manipulación óptima. Un experto en la técnica apreciará que al crear la ampolla de acuerdo con los métodos y sistemas de la invención se debe mantener la presión intraocular apropiada para evitar daños a las estructuras oculares. El tamaño de cada ampolla individual puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,2 ml, de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,2 ml, de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,2 ml, de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,0 ml, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 ml, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0 ml. Por lo tanto, en un ejemplo, para inyectar un total de 3 ml de suspensión de composición de rAAV, se pueden establecer 3 ampollas de aproximadamente 1 ml cada una. El volumen total de todas las ampollas combinadas puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 ml, de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 3,0 ml, de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 3,0 ml, de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 3,0 ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 ml, de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,2 ml, de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 3,0 ml, de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 2,0 ml, de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,0 ml.

Con el fin de transducir de manera segura y eficaz áreas de la retina diana (por ejemplo, la retina central) fuera del borde de la ubicación original de la ampolla, la ampolla se puede manipular para reposicionar la ampolla al área diana para la transducción. La manipulación de la ampolla puede ocurrir por la dependencia de la ampolla que se

crea por el volumen de la ampolla, el reposicionamiento del ojo que contiene la ampolla, el reposicionamiento de la cabeza del ser humano con un ojo u ojos que contienen una

o más ampollas, y/o mediante un intercambio fluido-aire. Esto es particularmente relevante para la retina central, ya que esta área normalmente resiste el desprendimiento por inyección subretiniana. En algunas realizaciones, el intercambio fluido-aire se utiliza para reubicar la ampolla; el fluido de la cánula de infusión se reemplaza temporalmente por aire, por ejemplo, de soplar aire sobre la superficie de la retina. A medida que el volumen del aire desplaza el fluido de la cavidad vítrea de la superficie de la retina, el fluido en la cavidad vítrea puede fluir fuera de una cánula. La falta temporal de presión del fluido de la cavidad vítrea hace que la ampolla se mueva y grave a una parte dependiente del ojo. Al ubicar el globo ocular apropiadamente, la ampolla de la composición de rAAV subretiniana se manipula para implicar áreas adyacentes (por ejemplo, la mácula y/o la fovea). En algunos casos, la masa de la ampolla es suficiente para hacer que grave, incluso sin el uso del intercambio fluido-aire. El movimiento de la ampolla a la ubicación deseada se puede facilitar además alterando la posición de la cabeza del sujeto, de modo que permita que la ampolla grave a la ubicación deseada en el ojo. Una vez que se logra la configuración deseada de la ampolla, el fluido se devuelve a la cavidad vítrea. El fluido es un fluido apropiado, por ejemplo, solución salina recién preparada. En general, la composición de rAAV subretiniana se puede dejar in situ sin retinopexia a la retinotomía y sin taponamiento intraocular, y la retina se volverá a adherir espontáneamente en aproximadamente 48 horas.

Al transducir de manera segura y eficaz células oculares (por ejemplo, células de la malla trabecular) con un vector que comprende un polipéptido terapéutico o secuencia de ARN, los métodos de la invención se pueden usar para tratar a un individuo; por ejemplo, un ser humano, que tiene un glaucoma de miocilina (MYOC), en donde las células transducidas producen el polipéptido terapéutico o secuencia de ARN en una cantidad suficiente para tratar glaucoma de miocilina (MYOC).

Se administra una cantidad eficaz de rAAV (en algunas realizaciones en forma de partículas), dependiendo de los objetivos del tratamiento. Por ejemplo, cuando un porcentaje bajo de transducción puede conseguir el efecto terapéutico deseado, entonces el objetivo del tratamiento en general es satisfacer o superar este nivel de transducción. En algunos casos, este nivel de transducción puede conseguirse mediante la transducción de tan solo aproximadamente un 1 a un 5 % de las células diana, en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 20 % de las células del tipo de tejido deseado, en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 50 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 80 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 95 %, en algunas realizaciones al menos aproximadamente un 99 % de las células del tipo de tejido deseado. Como se ha tratado anteriormente, la sustitución de uno o más aminoácidos de la cápside de rAAV que interactúa con HSPG mejora la transducción de rAAV. Como guía, el número de partículas administradas por inyección es, en general, entre aproximadamente 1×10^6 y aproximadamente 1×10^{14} partículas, entre aproximadamente 1×10^7 y 1×10^{13} partículas, entre aproximadamente 1×10^9 y 1×10^{12} partículas o aproximadamente 1×10^{11} partículas. La composición de rAAV se puede administrar mediante una o más inyecciones subretinianas, ya sea durante

el mismo procedimiento o espaciado por días, semanas, meses o años. En algunas realizaciones, pueden usarse múltiples vectores para tratar al ser humano.

En algunas realizaciones, la administración al ojo de una cantidad eficaz de partículas víricas de rAAV da como resultado más de aproximadamente cualquiera de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% o 100% de transducción o cualquier % intermedio de células oculares. En algunas realizaciones, se transdujeron de aproximadamente un 5% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 10% a aproximadamente un 50%, de aproximadamente un 10% a aproximadamente un 30%, de aproximadamente un 25% a aproximadamente un 75%, de aproximadamente un 25% a aproximadamente un 50% o de aproximadamente un 30% a aproximadamente un 50% de las células oculares. Los métodos de identificación de células oculares transducidas por partículas víricas de AAV que comprenden una cápside de rAAV son conocidos en la técnica; por ejemplo, puede usarse inmunohistoquímica o el uso de un marcador, tal como proteína fluorescente verde potenciada, para detectar la transducción de partículas víricas.

En algunas realizaciones, la administración a la malla trabecular de una cantidad eficaz de partículas víricas de rAAV da como resultado más de aproximadamente cualquiera de 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% o 100% de transducción o cualquier % intermedio de células de la malla trabecular. En algunas realizaciones, se transducen de aproximadamente un 5% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 10% a aproximadamente un 50%, de aproximadamente un 10% a aproximadamente un 30%, de aproximadamente un 25% a aproximadamente un 75%, de aproximadamente un 25% a aproximadamente un 50% o de aproximadamente un 30% a aproximadamente un 50% de las células de la malla trabecular. Los métodos de identificación de células de la malla ocular transducidas por partículas víricas de AAV que comprenden una cápside de rAAV son conocidos en la técnica; por ejemplo, puede usarse inmunohistoquímica o el uso de un marcador, tal como proteína fluorescente verde potenciada, para detectar la transducción de partículas víricas.

En algunas realizaciones de la invención, los métodos comprenden la administración al ojo de un mamífero de una cantidad eficaz de partículas víricas de AAV para el tratamiento de un individuo con un glaucoma de miocilina (MYOC); por ejemplo, un ser humano con un glaucoma de miocilina (MYOC). En algunas realizaciones, la composición se inyecta en una o más ubicaciones en el ojo para permitir la expresión de un ácido nucleico heterólogo en células oculares. En algunas realizaciones, la composición se inyecta en uno cualquiera de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez ubicaciones en el ojo.

En algunas realizaciones de la invención, los métodos comprenden la administración a la malla trabecular de un mamífero de una cantidad eficaz de partículas víricas de AAV para tratar a un individuo con un glaucoma de miocilina (MYOC); por ejemplo, un ser humano con un glaucoma de miocilina (MYOC). En algunas realizaciones, la composición se inyecta en una o más ubicaciones en la malla trabecular para permitir la expresión de un ácido nucleico heterólogo en las células de la malla trabecular.

En algunas realizaciones, la composición se inyecta en uno cualquiera de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de diez localizaciones en la malla trabecular.

En algunas realizaciones, las partículas víricas de rAAV se administran a más de una ubicación simultánea o secuencialmente. En algunas realizaciones, múltiples inyecciones de partículas víricas de rAAV no están espaciadas más de una hora, dos horas, tres horas, cuatro horas, cinco horas, seis horas, nueve horas, doce horas o 24 horas.

Métodos de inyección intravítrea

El método general para la inyección intravítrea se puede ilustrar mediante el siguiente esquema breve. Este ejemplo pretende simplemente ilustrar ciertas características del método, y no pretende en modo alguno ser limitante. Los procedimientos para la inyección intravítrea son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Peyman, G.A., et al (2009) Retina 29(7):875-912 y Fagan, X.J. y Al-Qureshi, S. (2013) Clin. Experiment. Ophthalmol. 41(5):500-7).

Brevemente, un sujeto para inyección intravítrea se puede preparar para el procedimiento mediante dilatación pupilar, esterilización del ojo y administración de anestésico. Se puede usar cualquier agente midriático adecuado conocido en la técnica para la dilatación pupilar. Se puede confirmar una dilatación pupilar adecuada antes del tratamiento. La esterilización se puede lograr aplicando un tratamiento ocular esterilizante, por ejemplo, una disolución que contiene yoduro, tal como povidona yodada (BETADINE®). También se puede usar una disolución similar para limpiar el párpado, las pestañas y cualquier otro tejido cercano (por ejemplo, piel). Se puede usar cualquier anestésico adecuado, tal como lidocaína o proparacaína, a cualquier concentración adecuada. El anestésico se puede administrar mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, sin limitación, gotas tópicas, geles o gelatinas, y la aplicación subconjuntiva de anestésico.

Antes de la inyección, se puede usar un blefaróstato esterilizado para limpiar las pestañas del área. El lugar de la inyección puede marcarse con una jeringa. El lugar de la inyección se puede elegir basándose en el cristalino del paciente. Por ejemplo, el lugar de inyección puede estar a 3-3,5 mm del limbo en pacientes pseudofáquicos o afáquicos, y a 3,5-4 mm del limbo en pacientes fáquicos. El paciente puede mirar en una dirección opuesta al lugar de inyección.

Durante la inyección, la aguja se puede insertar perpendicular a la esclerótica y apuntar hacia el centro del ojo. La aguja se puede insertar de manera que la punta termine en el vítreo, en lugar del espacio subretiniano. Se puede usar cualquier volumen adecuado conocido en la técnica para inyección. Después de la inyección, el ojo se puede tratar con un agente esterilizante tal como un antibiótico. El ojo también se puede enjuagar para eliminar el exceso de agente esterilizante.

Métodos de inyección intracameral

Los métodos de inyección intracameral al ojo son conocidos en la técnica. Buie, et al., (2010) IOVS 51(1):236-248 proporciona un ejemplo no limitante de inyección intracameral.

La eficacia de la administración de rAAV mediante inyección intravítrea o intracameral se puede monitorizar mediante varios criterios como se describen en el presente documento. Por ejemplo, después del tratamiento en un sujeto usando métodos de la presente invención, el sujeto puede evaluarse para, por ejemplo, una mejora y/o estabilización y/o retardo en la progresión de uno o más signos o síntomas de la patología mediante uno o más parámetros clínicos, incluyendo los descritos en este documento. Ejemplos de dichas pruebas son conocidos en la técnica, e incluyen medidas objetivas, así como subjetivas (por ejemplo, notificadas por el sujeto). Por ejemplo, para medir la eficacia de un tratamiento en la función visual de un sujeto, se pueden evaluar uno o más de los siguientes: la calidad subjetiva de la visión del sujeto o la función de visión central mejorada (por ejemplo, una mejora en la capacidad del sujeto para leer con fluidez y reconocer caras), la movilidad visual del sujeto (por ejemplo, una disminución en el tiempo necesario para navegar en un laberinto), agudeza visual (por ejemplo, una

mejora en la puntuación LogMAR del sujeto), microperimetría (por ejemplo, una mejora en la puntuación dB del sujeto), perimetría adaptada a la oscuridad (por ejemplo, una mejora en la puntuación dB del sujeto), mapeo de matriz fina (por ejemplo, una mejora en la puntuación dB del sujeto), perimetría de Goldmann (por ejemplo, un tamaño reducido de área escotomatosas (es decir, áreas de ceguera) y mejora de la capacidad para resolver objetivos más pequeños), sensibilidades de parpadeo (por ejemplo, una mejora en hercios), autofluorescencia y mediciones electrofisiológicas (por ejemplo, mejora en ERG). En algunas realizaciones, la función visual se mide mediante la movilidad visual del sujeto. En algunas realizaciones, la función visual se mide mediante la agudeza visual del sujeto. En algunas realizaciones, la función visual se mide mediante microperimetría. En algunas realizaciones, la función visual se mide mediante perimetría adaptada a la oscuridad. En algunas realizaciones, la función visual se mide mediante ERG. En algunas realizaciones, la función visual se mide por la calidad subjetiva de visión del sujeto.

Para cualquiera de los métodos o composiciones descritos en el presente documento, se puede usar una prueba médica para el glaucoma de miocilina (MYOC) para evaluar la eficacia de un tratamiento descrito en el presente documento o diagnosticar a un paciente que puede beneficiarse de un tratamiento descrito en el presente documento. En la técnica se conocen numerosas pruebas médicas para diagnosticar o monitorizar el glaucoma de miocilina (MYOC). Por ejemplo, puede usarse oftalmoscopia, polarimetría láser, tomografía de coherencia ocular y/o tomografía láser de barrido para inspeccionar el nervio óptico, que puede estar dañado por el glaucoma de miocilina (MYOC). La presión intraocular puede medirse por tonometría. Se puede utilizar un paquímetro para medir el grosor de la córnea central (por ejemplo, el grosor de la córnea central delgado puede ser

predictivo de glaucoma de miocilina (MYOC)). Para evaluar el campo visual se puede usar un ensayo de campo visual.

Como se ha descrito anteriormente, las mutaciones de miocilina se han implicado en el glaucoma primario de miocilina (MYOC) de ángulo abierto (POAG). Por lo tanto, puede usarse una prueba médica para diagnosticar POAG para evaluar la eficacia de un tratamiento descrito en el presente documento o diagnosticar a un paciente que puede beneficiarse de un tratamiento descrito en el presente documento. Se puede usar cualquier prueba médica para diagnosticar POAG conocida en la técnica, por ejemplo, para distinguir POAG de otra forma de glaucoma de miocilina (MYOC) (tal como glaucoma de cierre angular). Por ejemplo, se puede usar gonioscopia para proporcionar una evaluación que ayude en el diagnóstico de POAG.

La eficacia de los tratamientos para el glaucoma de miocilina (MYOC) se puede evaluar en un modelo animal. En la técnica se conocen modelos animales para glaucoma de miocilina (MYOC). Por ejemplo, se ha demostrado que los ratones que expresan MYOC humana Y437H o MYOC de ratón Y423H desarrollan síntomas de glaucoma de miocilina (MYOC) similares a POAG (véase Zode et al. (2011) J. Clin. Invest. 121(9):3542-53 y Senatorov, V., et al. (2006) J. Neurosci. 26(46):11903-14). Además, los ratones que carecen de la subunidad alfa de la guanilato ciclasa soluble del receptor de óxido nítrico son otro modelo de POAG (Buys, E.S., et al. (2013) PLoS ONE 8(3):e60156). También se han desarrollado modelos de rata; las ratas que expresan TGF-beta humano administradas mediante transferencia de genes adenovíricos muestran un aumento de la PIO (Shepard, A.R., et al. (2010) Invest. Ophthalmol. 51(4):2067-76). Se puede encontrar una descripción adicional de otros modelos animales para diversos aspectos de POAG, incluyendo modelos de primate, perro y pez cebra, en Bouhenni, R.A., et al. (2012) J. Biomed. Biotechnol. 2012:692609).

En algunos trastornos oculares, existe un fenómeno de "célula enfermera", en el que mejorar la función de un tipo de célula mejora la función de otra. Por ejemplo, la transducción del RPE de la retina central por un rAAV de la invención puede mejorar entonces la función de los bastones, y a su vez, la función mejorada de los bastones da como resultado una función mejorada de los conos. Por consiguiente, el tratamiento de un tipo de célula puede dar como resultado una función mejorada en otra. En el glaucoma de miocilina (MYOC), la reducción de la PIO mediante la transducción de la TM reducirá la degeneración de la estructura y función de las células ganglionares.

La selección de un vector rAAV y composición particular depende de varios factores diferentes incluyendo, aunque sin limitación, los antecedentes médicos del ser humano individual y los rasgos de la afección y el individuo que se está tratando. La evaluación de dichos rasgos y el diseño de una pauta terapéutica apropiada es en última instancia responsabilidad del médico prescriptor.

Las composiciones de la divulgación (por ejemplo, partículas víricas de AAV que codifican RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional de las mismas y/o iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc)) se pueden usar solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para tratar trastornos oculares. El intervalo entre la administración secuencial puede ser en términos de al menos (o, alternativamente, menos de) minutos, horas o días.

En algunas realizaciones, se pueden administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales a la malla trabecular. Los ejemplos no limitantes del agente terapéutico adicional incluyen prostaglandinas tales como Xalatan, Lumigan, Travatan Z y Rescula; beta-bloqueantes que incluyen Timoptic XE, Istalol y Betoptic S; agonistas alfa-adrenérgicos, incluyendo lopidina, Alphagan y Alphagan-P; inhibidores de la anhidrasa carbónica, incluidos Trusopt y Azopt,

Diamox, Neptazane y Daranide; parasimpaticomiméticos que incluyen pilocarpina, carbacol, ecotiofato y demecario; epinefrinas que incluyen Propine; o tratamientos combinados que incluyen Cosopt, Combigan y DuoTrav.

IV. Construcciones de expresión

La divulgación proporciona métodos de administración de ácido nucleico heterólogo al ojo mediante administración subretiniana de un vector de rAAV que comprende el ácido nucleico heterólogo y en donde el vector rAAV está encapsidado en una cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones de aminoácidos que interactúan con HSPG. En algunos casos, el ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, un transgén) se une operativamente a un promotor. En la invención, la partícula de rAAV comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2 o RSPO4, en donde RSPO1, RSPO2, o RSPO4 se une operativamente a un promotor. Promotores a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMV), el LTR de RSV, el LTR de MoMLV, el promotor de fosfoglicerato quinasa- 1 (PGK), un promotor de virus de simio 40 (SV40) y un promotor de CK6, un promotor de transtiretina (TTR), un promotor TK, un promotor sensible a tetraciclina (TRE), un promotor de VHB, un promotor de hAAT, un promotor de LSP, promotores quiméricos específicos del hígado (LSP), el promotor E2F, el promotor de la telomerasa (hTERT); el potenciador del citomegalovirus/beta-actina de pollo/promotor de β -globina de conejo (promotor CAG; Niwa et al., Gene, 1991, 108(2): 193-9) y el promotor del factor de elongación 1-alfa (EFL-alfa) (Kim et al., Gene, 1990, 91(2):217-23 y Guo et al., Gene Ther., 1996, 3(9):802-10). En algunas realizaciones, el promotor comprende un promotor de la β -glucuronidasa humana o un potenciador de citomegalovirus unido a un promotor de β -actina de pollo (CBA). El promotor puede ser un promotor constitutivo, inducible o reprimible. En algunos casos, el promotor es capaz de expresar el ácido nucleico heterólogo en una célula del ojo. En la invención, RSPO1, RSPO2 o RSPO4 se une operativamente a un promotor, en donde el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en el ojo del mamífero y/o en células de la malla trabecular. En algunos casos, el promotor es capaz de expresar el ácido nucleico heterólogo en células fotorreceptoras o RPE. En algunos casos, el promotor es un promotor de rodopsina cinasa (RK); por ejemplo, un promotor RK humano. En algunos

casos, el promotor es un promotor de opsina; por ejemplo, un promotor de opsina humana o un promotor de opsina de ratón. En algunos casos, el promotor es un promotor de la ARN polimerasa III. En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de tratamiento de glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero (por ejemplo, un ser humano) mediante la administración al ojo del mamífero de una partícula de rAAV que comprende un vector de rAAV que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional del mismo, bajo el control de un promotor de CBA. En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero (por ejemplo, un ser humano) administrando al ojo del mamífero una partícula de rAAV que comprende un vector de rAAV que codifica una iARN (por ejemplo, ARNhc) que se dirige (por ejemplo, reduce o inhibe) a una MYOC (por ejemplo, una MYOC humana) bajo el control de un promotor de CBA. En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero (por ejemplo, un ser humano) administrando al ojo del mamífero una partícula de rAAV que comprende un vector de rAAV que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional del mismo, bajo el control de un promotor de CBA y una partícula de rAAV que comprende un vector de rAAV que codifica una iARN (por ejemplo, ARNhc) que se dirige (por ejemplo, reduce o inhibe) a una MYOC (por ejemplo, una MYOC humana) bajo el control de un promotor de CBA. En algunos casos, la divulgación proporciona métodos de tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero (por ejemplo, un ser humano) administrando al ojo del mamífero una partícula de rAAV que comprende un vector rAAV que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional del mismo, bajo el control de un promotor de CBA y una iARN (por ejemplo, ARNhc) que se dirige (por ejemplo, reduce o inhibe) a una MYOC (por ejemplo, una MYOC humana) bajo el control de un promotor de CBA.

La presente solicitud contempla el uso de un genoma vírico recombinante para la introducción de una o más secuencias de ácido nucleico que codifican un polipéptido y/o ácido nucleico terapéutico para encapsidarse en una partícula vírica de rAAV. El genoma vírico recombinante puede incluir cualquier elemento para establecer la expresión del polipéptido y/o ácido nucleico terapéutico, por ejemplo, un promotor, una ITR, un elemento de unión al ribosoma, terminador, potenciador, marcador de selección, intrón, señal de poliA y/u origen de replicación.

En algunos casos, la divulgación proporciona partículas víricas que comprenden un genoma autocomplementario recombinante. Las partículas víricas de AAV con genomas autocomplementarios y los métodos de uso de genomas de AAV autocomplementarios se describen en las patentes de EE. UU. n.º 6.596.535; 7.125.717; 7.765.583; 7.785.888; 7.790.154; 7.846.729; 8.093.054; y 8.361.457; y Wang Z., et al., (2003) Gene Ther 10:2105-2111. Un rAAV que comprende un genoma autocomplementario formará rápidamente una molécula de ADN bicatenario en virtud de sus secuencias parcialmente complementarias (por ejemplo, hebras codificantes y no codificantes complementarias de un transgén). En algunos casos, la primera secuencia de ácido nucleico heteróloga y una segunda secuencia de ácido nucleico heteróloga se unen por una ITR mutada (por ejemplo, la ITR derecha). En algunos casos, la ITR comprende la secuencia polinucleotídica 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCGACCAAAGGTCGCCACG CCGGCTTTGCCGGCG-3' (SEQ ID NO:20). La ITR mutada comprende una delección de la región D que comprende la secuencia de resolución terminal. Como resultado, al replicar un genoma vírico de AAV, las proteínas

rep no escindirán el genoma vírico en la ITR mutada y como tal un genoma vírico recombinante que comprende lo siguiente en orden 5' a 3' se encapsidará en una cápside vírica: una ITR de AAV, la primera secuencia polinucleotídica heteróloga incluyendo secuencias reguladoras, la ITR de AAV mutada, el segundo polinucleótido heterólogo en orientación inversa al primer polinucleótido heterólogo y una tercera ITR de AAV.

VI. Partículas víricas y métodos de producción de partículas víricas

Partículas víricas de rAAV

La invención se refiere al uso de partículas de rAAV para tratar glaucoma de miocilina (MYOC) y composiciones que comprenden partículas de rAAV se divulgan en el presente documento. En algunos casos, la partícula vírica es una partícula de AAV recombinante que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional del mismo, y/o una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) descrito en el presente documento flanqueado por una o dos ITR. El ácido nucleico está encapsidado en la partícula de AAV. La partícula de AAV también comprende proteínas de la cápside. En algunos casos, el ácido nucleico comprende la o las secuencias codificantes de componentes unidos operativamente de interés (por ejemplo, ácido nucleico que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional del mismo, y/o una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc)) en la dirección de la transcripción, secuencias de control que incluyen secuencias de inicio y terminación de la transcripción, formando de este modo un casete de expresión. El casete de expresión está flanqueado en el extremo 5' y 3' por al menos una secuencia ITR de AAV funcional. Por "secuencias funcionales de ITR de AAV" se entiende que las secuencias de ITR funcionan como se pretende para el rescate, la replicación y la encapsidación del virión de AAV. Véase Davidson et al., PNAS, 2000, 97(7):3428-32; Passini et al., J. Virol., 2003, 77(12):7034-40; y Pechan et al., Gene Ther., 2009, 16: 10-16. De acuerdo con la invención, la partícula vírica es una partícula de rAAV que comprende un vector que codifica RSPO1, RSPO2 o RSPO4, en donde RSPO1, RSPO2 o RSPO4 se une operativamente a un promotor. Para poner en práctica algunos aspectos de la invención, los vectores recombinantes comprenden al menos todas las secuencias de AAV esenciales para la encapsidación y las estructuras físicas para la infección por el rAAV. Las ITR de AAV para su uso en los vectores de la invención no necesitan tener una secuencia de nucleótidos natural (por ejemplo, tal como se describe en Kotin, Hum. Gene Ther., 1994, 5:793-801), y se pueden alterar mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos o las ITR de AAV pueden derivar de cualquiera de varios serotipos de AAV. Actualmente se conocen más de 40 serotipos de AAV, y se siguen identificando nuevos serotipos y variantes de serotipos existentes. Véase Gao et al., PNAS, 2002, 99(18): 11854-6; Gao et al., PNAS, 2003, 100(10):6081-6; y Bossis et al., J. Virol., 2003, 77(12):6799-810. El uso de cualquier serotipo de AAV se considera dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones, un vector rAAV es un vector derivado de un serotipo de AAV incluyendo, sin limitación, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón o similares. En algunas realizaciones, el ácido nucleico en el AAV comprende una ITR de repeticiones terminales invertidas (ITR) de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV2R471A, AAV DJ, AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón o similares. En algunos casos, el ácido nucleico en el AAV codifica además un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional del mismo; iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc); o un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional del mismo, y MYOC como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el ácido nucleico en el AAV puede comprender al menos una ITR de cualquier serotipo de AAV contemplado en el presente documento y puede codificar además un ácido nucleico que codifica una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) que se dirige a SEQ ID NO:6 y que comprende la secuencia de bucle de SEQ ID NO:7 y/o una o más de: una RSPO1 que comprende SEQ ID NO:8, 11 y/o 12; una RSPO2 que comprende SEQ ID NO:9, 13 y/o 14; y/o una SPO3, que comprende SEQ ID NO:1, 15, 16 y/o 17; y una RSPO4 que comprende SEQ ID NO: 10, 18 y/o 19. En algunos casos, el ácido nucleico codifica una RSPO1 que es al menos aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a SEQ ID NO: 8, 11 o 12; una RSPO2 que es al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a SEQ ID NO: 9, 13 o 14; una RSPO3 que es al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a SEQ ID NO: 1 o 15-17; o una RSPO4 que es al menos aproximadamente 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a SEQ ID NO: 10, 18 o 19.

En realizaciones adicionales, la partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 (por ejemplo, una cápside de AAV6 natural, o una cápside de AAV6 variante tal como ShH10, como se describe en la publicación previa a la concesión de EE. UU. 2012/0164106), AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9 (por ejemplo, una cápside de AAV9 natural, o una cápside de AAV9 modificada como se describe en la publicación previa a la concesión de EE. UU. 2013/0323226), AAV10, AAVRH10, AAV11, AAV12, un mutante de la cápside de tirosina, un mutante de la cápside de unión a heparina, una cápside de AAV2R471A, una cápside de AAVAAV2/2-7m8, una cápside de DJ de AAV

(por ejemplo, una cápside de AAV-DJ/8, una cápside de AAV-DJ/9 o cualquier otra de las cápsides descritas en la publicación previa a la concesión de EE. UU. 2012/0066783), cápside de AAV2 N587A, cápside de AAV2 E548A, cápside de AAV2 N708A, cápside de AAV V708K, cápside de AAV de cabra, cápside quimérica de AAV1/AAV2,

cápside de AAV bovino, cápside de AAV de ratón, cápside de rAAV2/HBoV1, o una cápside de AAV descrita en la patente de Estados Unidos n.º 8.283.151 o la publicación internacional n.º WO/2003/042397. En algunas realizaciones, la partícula vírica de AAV comprende una cápside de AAV que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones R484, R487, K527, K532, R585 o R588, numeración basada en VP1 de AAV2. En realizaciones adicionales, una partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside de un serotipo de AAV de los clados A-F. En algunas realizaciones, una proteína de la cápside mutante mantiene la capacidad de formar una cápside de AAV. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una proteína de la cápside que permite la transducción de la malla trabecular. En algunas realizaciones, las partículas de rAAV comprenden una proteína de la cápside mutante que permite la transducción de la malla trabecular. En algunas realizaciones, la partícula de rAAV comprende proteínas de la cápside de AAV2, en donde la proteína de la cápside comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración basada en VP1 de AAV2 (Lochrie et al., J Virol (2006) 80(2):821-834). En algunos casos, la divulgación proporciona partículas de rAAV que comprenden un vector que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional del mismo; una cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración basada en VP1 de AAV2; y/o un vector que codifica iARN de MYOC (por ejemplo, ARNh_c).

En algunos casos, la divulgación proporciona composiciones y métodos para tratar el glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, en donde una partícula vírica de rAAV2 que comprende un vector de rAAV que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional del mismo, se administra al ojo del mamífero donde se pueden transducir diferentes partes del ojo (por ejemplo, la retina) y una partícula vírica de rAAV2 R471A que comprende un vector de rAAV que codifica una iARN de MYOC se administra al ojo del mamífero donde se transducen células de la malla trabecular. En algunos casos, la divulgación proporciona composiciones y métodos para tratar el glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, en donde una partícula vírica de rAAV2 R471A que comprende un vector de rAAV que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional del mismo, y una partícula vírica de rAAV2 R471A que comprende un vector de rAAV que codifica una iARN de MYOC se administran al ojo del mamífero donde se transducen células de la malla trabecular. En algunos casos, la divulgación proporciona composiciones y métodos para tratar el glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, en donde una partícula vírica de rAAV2 de R471A que comprende un vector de rAAV que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional del mismo, y que codifica una iARN de MYOC se administran al ojo del mamífero donde se transducen células de la malla trabecular.

En algunos casos, la divulgación proporciona composiciones y métodos para administrar un transgén (por ejemplo, un transgén terapéutico a la malla trabecular del ojo). En algunos casos, las composiciones y métodos usan una partícula de rAAV2 que comprende una cápside mutante donde la cápside comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración con respecto a VP1 de AAV2. Dichas composiciones y métodos se pueden usar en el tratamiento de enfermedades oculares; por ejemplo, enfermedad ocular asociada con la malla trabecular, tal como glaucoma de miocilina (MYOC).

Se usan diferentes serotipos de AAV para optimizar la transducción de células diana particulares o para dirigirse a tipos de células específicos dentro de un tejido diana particular (por ejemplo, un tejido enfermo). Una partícula de rAAV puede comprender proteínas víricas y ácidos nucleicos víricos del mismo serotipo o un serotipo mixto.

Genomas víricos autocomplementarios del AAV

En algunos casos, la divulgación proporciona partículas víricas que comprenden un genoma autocomplementario recombinante. Las partículas víricas de AAV con genomas autocomplementarios y los métodos de uso de genomas de AAV autocomplementarios se describen en las patentes de EE. UU. n.º 6.596.535; 7.125.717; 7.765.583; 7.785.888; 7.790.154; 7.846.729; 8.093.054; y 8.361.457; y Wang Z., et al., (2003) Gene Ther 10:2105-2111. Un rAAV que comprende un genoma autocomplementario formará rápidamente una molécula de ADN bicatenario en virtud de sus secuencias parcialmente complementarias (por ejemplo, complementando hebras codificantes y no codificantes de un transgén). En algunos casos, la divulgación proporciona una partícula vírica de AAV que comprende un genoma de AAV, en donde el genoma de rAAV comprende una primera secuencia polinucleotídica heteróloga (por ejemplo, miR-708 y/o una hebra codificante de rodopsina) y una segunda secuencia polinucleotídica heteróloga (por ejemplo, cadena antisentido de miR-708 y/o una cadena no codificante o antisentido de rodopsina) en donde la primera secuencia polinucleotídica heteróloga puede formar pares de bases intracatenarios con la segunda secuencia polinucleotídica en la mayor parte o en toda su longitud. En algunos casos, la primera secuencia polinucleotídica heteróloga y una segunda secuencia polinucleotídica heteróloga están unidas por una secuencia que facilita el apareamiento de bases intracatenario; por ejemplo, una estructura de ADN horquillado. En la técnica se conocen estructuras de horquilla, por ejemplo, en moléculas de ARN_i. En algunos casos, la primera secuencia polinucleotídica heteróloga y una segunda secuencia polinucleotídica heteróloga están unidas por una ITR mutada (por ejemplo, la ITR derecha). En algunos casos, la ITR comprende la secuencia polinucleotídica 5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCC ACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCG-3' (SEQ ID NO:20). La ITR mutada comprende una delección de la región D que comprende la secuencia de resolución terminal. Como resultado, al replicar un genoma vírico de AAV, las proteínas rep no escindirán el genoma vírico en la ITR mutada y como tal un genoma vírico recombinante que comprende lo siguiente en orden 5' a 3' se encapsidará en una cápside vírica: una ITR de AAV, la primera secuencia

polinucleotídica heteróloga incluyendo secuencias reguladoras, la ITR de AAV mutada, el segundo polinucleótido heterólogo en orientación inversa al primer polinucleótido heterólogo y una tercera ITR de AAV. En algunos casos, la divulgación proporciona partículas víricas de AAV que comprenden un genoma vírico recombinante que comprende una ITR de AAV2 funcional, una primera secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional del mismo, y/o una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc), una ITR de AAV2 mutada que comprende una delección de la región D y que carece de una secuencia de resolución terminal funcional, una segunda secuencia polinucleotídica que comprende la secuencia complementaria a la secuencia que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional del mismo, y/o una iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc), de la primera secuencia polinucleotídica y una ITR de AAV2 funcional.

Producción de partículas de AAV

Las partículas de rAAV se pueden producir usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6.566.118; 6.989.264; y 6.995.006. En la práctica de la invención, las células hospedadoras para producir partículas de rAAV incluyen células de mamífero, células de insecto, células vegetales, microorganismos y levaduras. Las células hospedadoras también pueden encapsidar células en las que los genes rep y cap de AAV se mantienen de forma estable en la célula hospedadora o células productoras en las que el genoma del vector de AAV se mantiene de forma estable. Las células de encapsidación y productoras a modo de ejemplo derivan de células 293, A549 o HeLa. Los vectores de AAV se purifican y formulan usando técnicas estándar conocidas en la técnica.

En algunos aspectos, se divulga un método para producir cualquier partícula de rAAV como se divulga en el presente documento que comprende (a) cultivar una célula hospedadora en una condición en que se producen partículas de rAAV, en donde la célula hospedadora comprende (i) uno o más genes de encapsidación de AAV, en donde cada uno de dicho gen de encapsidación de AAV codifica una proteína de replicación y/o encapsidación de AAV; (ii) un provector de rAAV que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido y/o ácido nucleico terapéutico como se describe en el presente documento flanqueado por al menos una ITR de AAV, y (iii) una función auxiliar de AAV; y (b) recuperar las partículas de rAAV producidas por la célula hospedadora.

En casos adicionales, se purifican las partículas de rAAV. El término "purificado", como se usa en este documento, incluye una preparación de partículas de rAAV desprovistas de al menos algunos de los otros componentes que también pueden estar presentes cuando las partículas de rAAV se producen de manera natural o se preparan inicialmente a partir de los mismos.

Por tanto, por ejemplo, pueden prepararse partículas de rAAV aisladas usando una técnica de purificación para enriquecerlas a partir de una mezcla de procedencia, tal como un lisado de cultivo o sobrenadante de cultivo de producción. El enriquecimiento puede medirse de una diversidad de formas, tales como, por ejemplo, mediante la proporción de partículas resistentes a DNasa (DRP) o copias genómicas (gc) presentes en una solución, o mediante la infectividad, o puede medirse con respecto a una segunda sustancia potencialmente interferente presente en la mezcla de procedencia, tales como contaminantes, incluyendo contaminantes de cultivo de producción o contaminantes del proceso, incluyendo virus auxiliares, componentes del medio y similares.

También se divulgan en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula de rAAV que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido terapéutico y/o ácido nucleico terapéutico, en donde la partícula de rAAV comprende una cápside de rAAV que comprende una o más sustituciones o aminoácidos que interactúan con HSPG, y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden ser adecuadas para cualquier modo de administración descrito en el presente documento; por ejemplo, mediante administración subretiniana.

En algunos casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden un rAAV descrito en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable son adecuadas para la administración a seres humanos. Dichos portadores son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15.^a edición, pág. 1035-1038 y 1570-1580). En algunos casos, las composiciones farmacéuticas que comprenden un rAAV descrito en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable son adecuadas para inyección ocular. Dichos portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceite, incluidos los de origen petrolero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y similares. También se pueden emplear soluciones salinas y disoluciones acuosas de dextrosa, polietilenglicol (PEG) y glicerol como portadores líquidos, particularmente para disoluciones inyectables. La composición farmacéutica puede comprender además ingredientes adicionales, por ejemplo, conservantes, tampones, agentes de tonicidad, antioxidantes y estabilizantes, agentes humectantes o clarificantes no iónicos, agentes que aumentan la viscosidad y similares. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden envasarse en dosis unitarias individuales o en formas multidosis. Las composiciones se formulan, en general, como una solución estéril y sustancialmente isotónica.

VII. Sistemas y kits

Las composiciones de rAAV como se describen en el presente documento pueden estar contenidas dentro de un sistema diseñado para su uso en uno de los métodos de la invención como se describen en el presente documento. En algunos casos, la divulgación proporciona un sistema para administrar un vector a un ojo de un individuo, que comprende a) una composición que comprende una cantidad eficaz de partículas de rAAV, en donde el vector comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica un polipéptido terapéutico y/o ARN terapéutico y al menos una repetición terminal de AAV; y b) un dispositivo para la administración ocular del rAAV. En algunos casos, las partículas de rAAV comprenden un vector de rAAV que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional del mismo. En algunos casos, las partículas de rAAV comprenden un vector de rAAV que codifica una o más iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) que se dirigen (por ejemplo, reduce o inhibe) a la expresión de MYOC. En algunos casos, las partículas de rAAV comprenden un vector de rAAV que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional del mismo, y una o más iARN(s) de MYOC (por ejemplo, ARNhc) que se dirigen (por ejemplo, reduce o inhibe) a la expresión de MYOC. En algunos casos, el kit o sistema comprende partículas de rAAV que comprenden un vector de rAAV que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4, o una variante funcional del mismo y partículas de rAAV que comprenden un vector de rAAV que codifica una o más iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) que se dirigen (por ejemplo, reduce o inhibe) a la expresión de MYOC.

En general, el sistema comprende una cánula de orificio fino, en donde la cánula es de calibre 27 a 45, una o más jeringas (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más) y uno o más fluidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o más) adecuados para su uso en los métodos de la invención.

La cánula de orificio fino es adecuada para la inyección subretiniana de la suspensión del vector y/u otros fluidos que se van a inyectar en el espacio subretiniano. En algunos casos, la cánula es de calibre 27 a 45. En algunos casos, la cánula de orificio fino es de calibre 35-41. En algunos casos, la cánula de orificio fino es de calibre 40 o 41. En algunos casos, la cánula de orificio fino es de calibre 41. La cánula puede ser cualquier tipo adecuado de cánula, por ejemplo, una cánula de-Juan® o una cánula Eagle®.

La jeringa puede ser cualquier jeringa adecuada, siempre que pueda conectarse a la aguja para el suministro de un líquido. En algunos casos, la jeringa es un sistema de jeringa Accurus®. En algunos casos, el sistema tiene una jeringa. En algunos casos, el sistema tiene dos jeringas. En algunos casos, el sistema tiene tres jeringas. En algunos casos, el sistema tiene cuatro o más jeringas.

El sistema puede comprender además una bomba de inyección automatizada, que se puede activar, por ejemplo, mediante un pedal de pie.

Los fluidos adecuados para su uso en los métodos de la invención incluyen los descritos en el presente documento, por ejemplo, uno o más fluidos, comprendiendo cada uno una cantidad eficaz de uno o más vectores como se describe en el presente documento, uno o más fluidos para crear una ampolla inicial (por ejemplo, solución salina u otro fluido apropiado), y uno o más fluidos que comprenden uno o más agentes terapéuticos.

Los fluidos adecuados para su uso en los métodos de la invención incluyen los descritos en el presente documento, por ejemplo, uno o más fluidos, comprendiendo cada uno una cantidad eficaz de uno o más vectores como se describe en el presente documento, uno o más fluidos para crear una ampolla inicial (por ejemplo, solución salina u otro fluido apropiado), y uno o más fluidos que comprenden uno o más agentes terapéuticos.

En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es mayor de aproximadamente 0,8 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es de al menos aproximadamente 0,9 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es de al menos aproximadamente 1,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es de al menos aproximadamente 1,5 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es de al menos aproximadamente 2,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es mayor de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 3,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es mayor de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 2,5 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es mayor de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 2,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es mayor de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,5 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es mayor de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 3,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 2,5 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 2,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,5 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es de aproximadamente 0,9 a aproximadamente 1,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es de aproximadamente 1,0 a

aproximadamente 3,0 ml. En algunas realizaciones, el volumen del fluido que comprende una cantidad eficaz del vector es de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 ml.

El fluido para crear la ampolla inicial puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 ml. En algunas realizaciones, el volumen total de todos los fluidos en el sistema es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 ml.

En algunas realizaciones, el kit comprende un único fluido (por ejemplo, un fluido que comprende una cantidad eficaz del vector). En algunos casos, el kit comprende 2 fluidos. En algunos casos, el kit comprende 3 fluidos. En algunos casos, el kit comprende 4 o más fluidos.

Los sistemas de la divulgación pueden envasarse además en kits, en donde los kits pueden comprender además instrucciones de uso. En algunos casos, los kits comprenden además un dispositivo para la administración subretiniano de composiciones de partículas de rAAV. En algunos casos, las instrucciones de uso incluyen instrucciones de acuerdo con uno de los métodos descritos en el presente documento. En algunos casos, las instrucciones de uso incluyen instrucciones para la administración intravítrea y/o intracameral de partículas de rAAV que comprenden un vector que codifica un polipéptido RSPO1, RSPO2, RSPO3, RSPO4 o una variante funcional del mismo, y/o iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc).

EJEMPLOS

La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos. Se entiende que los ejemplos y realizaciones descritos en el presente documento son únicamente con fines ilustrativos y que se sugerirán diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos a los expertos en la técnica.

Ejemplo 1: Las mutaciones glaucomatosas de MYOC (por ejemplo, P370L e Y437H) bloquean la secreción de MYOC

Para entender cómo los mutantes de MYOC afectan la función del ojo, particularmente las células, tales como las células de la malla trabecular que pueden contribuir a la PIO, proporcionarán información sobre la patogénesis del glaucoma de miocilina (MYOC). Comprender la función de MYOC también puede ayudar a descubrir estrategias terapéuticas potenciales para el glaucoma de miocilina (MYOC). Los resultados descritos en la presente demuestran que los mutantes de MYOC reducen la expresión de MYOC natural y bloquean la señalización de Wnt. Además, estos resultados indican que la expresión de R-espondina 3 (RSPO3) y/o el silenciamiento de MYOC puede restaurar la señalización de Wnt bloqueada por la expresión de MYOC mutante.

Métodos

Vectores plasmídicos

Para los plásmidos MYOC y RSPO3, el ADNc de MYOC se proporcionó por Clon DB- Sanofi Oncology. El ADNc de RSPO3 se proporcionó por Clon DB- Sanofi Oncology.

Para la construcción de pCBA2 en MYOC P370L, se usó el kit QUIKCHANGE® II (Agilent, Santa Clara) para introducir la sustitución de base única deseada siguiendo las recomendaciones del fabricante y los cebadores 5'-ACCACGGACAGTTCCIGTATTCTTGGGGTGG-3' (SEQ ID NO:21) y 5'-CCACCCAAGAATACAGGAAGTGTCCGTGGT-3' (SEQ ID NO:22).

Para la construcción de pCBA2 en MYOC Y437H, se usó el kit QUIKCHANGE® Lightning (Agilent, Santa Clara) para introducir la sustitución de base única deseada siguiendo las recomendaciones del fabricante y los cebadores 5'-TCTGTGGCACCTTGACACCGTCAGCAGC-3' (SEQ ID NO:23) y 5'-GCTGCTGACGGTGTCAAGGTGCCACAGA-3' (SEQ ID NO:24).

Se obtuvieron plásmidos de ARNhc de Grp94 de OriGene Technologies, Inc. (Cat. n.º TR312309). Los plásmidos pGIPZ-MYOC (Dharmacon GE Life Sciences) se proporcionaron por Clon DB- Sanofi Oncology. La colección de ARNhc adaptada a microARN de GIPZ (Stegmeier, et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102:13212-7). Los diseños de ARNhc de GIPZ se basan en el transcrito primario de miR-30 nativo para permitir el procesamiento por la vía de iARN endógena y dar como resultado un silenciamiento génico específico con toxicidad celular minimizada. El plásmido pGIPZ-nulo, un vector de miAARNhc constitutivo que expresa miAARNhc nulo, no dirigido, se proporcionó por Clon DB-Sanofi Oncology.

Cultivo celular y proteínas recombinantes

Se cultivaron células HEK293 (Microbix Biosystems Inc.) en DMEM, FCS al 10% y CO2 al 5%. La línea celular HEK293T (293T) se obtuvo de ATCC y se cultivó en DMEM, FCS al 10% y CO2 al 5%.

Inmortalización de células de la malla trabecular humana primaria (hTM)

Se usó el antígeno T grande de SV40 (marca SV40) para la inmortalización mediante transducción con un vector de antígeno T de AAV2-SV40. Se sembraron células hTM de pase 7 (ScienCell Research Laboratories, Carlsbad, CA) mantenidas en medio de crecimiento fibroblástico completo (ScienCell) sobre placas de cultivo celular de 10 cm y se transdujeron con 1×10^5 DRP de AAV2-SV40-marca (marcado "hTM-T") o AAV2-EGFP (control negativo, marcado "hTM-ENT") durante 24 horas. Una vez que las células alcanzaron la confluencia, se sometieron a pases en placas de 2×15 cm (P8). Las células se sometieron a pases repetidamente aproximadamente cada 3-4 días. En el pase 10, se tomó una alícuota para determinar un recuento celular. El número total de células de células hTM-T fue de $5,2 \times 10^6$, en comparación con $2,5 \times 10^5$ células totales a partir de las células hTM-ENT.

Se realizó transferencia de Western para determinar la presencia de antígeno T de SV40. Brevemente, se centrifugó una suspensión de 500 µl de células y el sedimento celular resultante se lisó en 100 µl de tampón RIPA que contenía una mezcla de inhibidor de proteasa. Se analizaron 5 µl de lisados celulares mediante SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia usando el sistema de transferencia rápida iBlot (Life Technologies). La transferencia se bloqueó usando bloqueador libre de proteína TBS (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) y se incubó con un anticuerpo monoclonal anti-antígeno T de SV40 (GeneTex, Irvine, CA). A continuación, la transferencia se incubó con un anticuerpo marcado con HRP anti-ratón (R&D Systems, Mineápolis, MN). Las bandas inmunorreactivas se visualizaron usando el sustrato quimioluminiscente Supersignal West Femto (Thermo Fisher). Se detectó una banda prominente de 80 kDa correspondiente al antígeno T de SV40 a partir de células hTM-T, pero no hTM-ENT, lo que indica la presencia y expresión del antígeno T de SV40. El lisado de células 293T sirvió como control positivo que también contenía la banda del antígeno T de SV40 de 80 kDa. Se expandieron células hTM-T y se congelaron bancos celulares en medio de congelación celular (Life Technologies, Grand Island, NY) en el pase 12 (10 viales en 1×10^6 células) y más tarde en el pase 18 (46 viales en 10^6 células).

Caracterización de hTM-T.

La comparación de las células hTM-T y las células hTM primarias mostró una marcada diferencia en la morfología celular, los tiempos de duplicación de la población y la eficacia de transfección de plásmidos. Las células hTM primarias parecían más grandes y parecidas a fibroblastos con un cuerpo celular largo, mientras que las células hTM-T inmortalizadas eran más pequeñas, de forma cúbica y un tamaño relativamente uniforme. La línea celular hTM-T demostró una tasa de crecimiento aumentada con duplicaciones de población ocurriendo aproximadamente 3-4 veces más rápido que las células primarias. Además, las células hTM-T continuaron proliferando más allá de 20 pases de células, mientras que las células hTM primarias mostraron una tasa de crecimiento reducida en el pase 10 y una eventual detención del crecimiento en el pase 12. La eficacia de la transfección se determinó usando un plásmido EGFP y lipofectamina en ambos tipos de células de densidad celular similar. Brevemente, se transfectaron células subconfluentes hTM-T o hTM con un plásmido EGFP usando Lipofectamine 2000 (Life Technologies) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Aunque las células hTM-T tenían mayor número de células por mm de superficie de cultivo celular, había claramente un mayor porcentaje de células EGFP+ hTM-T (~50%) en comparación con células hTM primarias (~5%).

Transferencia Western

Se transfectaron células 293T o hTM-T con plásmidos que expresaban wtMYOC, mutantes de MYOC P370L e Y437H, RSP03 y/o ARNhc usando Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Brevemente, las células se lisaron en 50-100 µl de tampón RIPA que contenía una mezcla de inhibidor de proteasa. Se analizaron 10-13 µl de lisados celulares mediante SDS-PAGE seguido de inmunotransferencia usando el sistema de transferencia rápida iBlot (Life Technologies). La transferencia se bloqueó usando solución salina tamponada con Tris, Tween 20 al 0,05% (TBST), I-Block al 0,2% (reactivo de bloqueo basado en Caseína; Life Technologies) y se incubó con un anticuerpo anti-MYOC humana de ratón. A continuación, la transferencia se incubó con un anticuerpo marcado con HRP anti-ratón (R&D Systems, Mineápolis, MN). Las bandas inmunorreactivas se visualizaron usando el sustrato quimioluminiscente ECL (Thermo Fisher) y se visualizaron en una película BioMax XAR (Carestream Health) desarrollada con un procesador Kodak X-Omat 2000.

Ensayo indicador de luciferasa

Se sembraron células 293T o hTM-T en placas de pared blanca o negra Costar de 96 pocillos a 2×10^4 /pocillo. Las transfecciones se realizaron 1-2 días después de la siembra celular usando el reactivo de transfección Eugene HD (Promega, Madison, WI) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Brevemente, el plásmido indicador Topflash (Millipore, Billerica, MA) que contenía una relación 40:1 del gen indicador de luciferasa de luciérnaga regulado por TCF/LEF y el gen de luciferasa *Renilla* impulsado por citomegalovirus (CMV) se mezcló 1:1 con plásmidos diana. Se añadieron 8 µl de reactivo Eugene HD, y las muestras se agitaron inmediatamente en vórtice y después se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron complejos de ADN plasmídico a las células y se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Las muestras o no estimularon o se estimularon con 400 ng/ml de proteína wnt3a humana o de ratón recombinante

(R&D Systems) y se incubaron durante 20-24 horas adicionales. La señalización de Wnt se midió usando el sistema de ensayo de luciferasa dual (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los valores de absorbancia se midieron en un luminómetro de microplacas Centro XS³ 960 (Berthold Technologies, Oak Ridge, TN) y se notificaron como unidades relativas de luz (URL). Para controlar la eficacia de la transfección, se normalizaron las URL de luciferasa de luciérnaga frente a las URL de luciferasa de *Renilla*. Todas las muestras se realizaron en pocillos triplicados.

Resultados

MYOC natural (wtMYOC) se secreta a partir de células cultivadas, pero se secreta poca o ninguna MYOC de células que expresan cinco formas mutantes diferentes de MYOC, y se ha informado que la cotransfección de células cultivadas con MYOC normal y mutante suprime la secreción de wtMYOC (Jacobson et al. (2001) Hum. Mol. Genet. 10(2):117-25). Con el fin de examinar los efectos de la expresión de MYOC mutante sobre la secreción de MYOC, se transfectaron células 293 con plásmidos que expresaban MYOC natural, MYOC mutante P370L o MYOC mutante Y437H.

Como se muestra en la **FIG. 1**, células 293 que expresaban MYOC natural mostraron una expresión detectable de la proteína MYOC en ambos lisados celulares (véase la transferencia inferior marcada "CÉLULAS") y se secretaron en el medio de cultivo celular (véase la transferencia superior "MEDIO"). Sin embargo, las células transfectadas con plásmidos que expresan MYOC P370L o Y437H mostraron expresión intracelular, pero no secreción en el medio de cultivo celular. Además, la cotransfección de células 293 con plásmidos que expresaban MYOC natural y MYOC P370L o Y437H provocó una falta de secreción de MYOC en el medio de cultivo celular. Estos resultados indican que los mutantes P370L e Y437H no se secretan a partir de células 293 y también son capaces de bloquear la secreción de MYOC natural.

Se llevaron a cabo experimentos adicionales para determinar si estos resultados se observan en células oculares humanas. Se immortalizó una línea celular de la malla trabecular humana mediante la expresión mediada por AAV del antígeno T grande de SV40 (células hTM-T), como se describió anteriormente. Se transfectaron células 293T y hTM-T con un plásmido que expresaba MYOC natural, un plásmido que expresaba MYOC P370L, o se transfectaron con ambos plásmidos. La **FIG. 2** muestra transferencias de Western que sondan la presencia de proteína MYOC intracelular o secretada en estas células. Aunque se expresó MYOC natural y se secretó por células 293T y hTM-T, se expresó MYOC P370L pero no se secretó tanto por células 293T como por células hTM-T. MYOC P370L también bloqueó la secreción de MYOC natural en células tanto 293T como hTM-T.

Estos resultados demuestran que los mutantes de MYOC glaucomatosos (por ejemplo, P370L e Y437H) son capaces de bloquear la secreción de MYOC natural en células humanas. Además, MYOC mutante también es capaz de bloquear la secreción de MYOC en células hTM.

Ejemplo 2: Las mutaciones de MYOC glaucomatosas (por ejemplo, P370L e Y437H) bloquean la señalización de Wnt

Se cree que MYOC interactúa con componentes de las vías de señalización de Wnt, tales como receptores Wnt de la familia Frizzled (FZD), antagonistas de Wnt de la familia de proteínas relacionadas con Frizzled secretadas (sFRP) y factor inhibidor de Wnt 1 (WIF-1), que modulan la organización del citoesqueleto de actina estimulando la formación de fibras de estrés (Kwon et al. (2009) Mod. Cell. Biol. 29:2139-54). La formación de fibras de estrés es fundamental para la contractilidad de la malla trabecular (TM) y la regulación de la PIO. Sin embargo, exactamente cómo se conecta MYOC a la señalización de Wnt, y cómo esta conexión afecta a PIO, no están claros. Basándose en experimentos biológicos celulares, se ha propuesto un papel de la miocilina como proteína matricelular (Resch y Fautsch, 2009; Koch et al, 2014). Otros grupos han demostrado que la miocilina es un mediador de la diferenciación de oligodendrocitos y está implicada en la mielinización del nervio óptico en ratones (Kwon et al., 2014).

Se indicó que MYOC puede servir como modulador de la señalización de Wnt y que las proteínas Wnt pueden compensar una ausencia de miocilina realizando sus funciones (Kwon et al. (2009) Mod. Cell. Biol. 29:2139-54). Varios grupos informaron similitudes entre las acciones de las proteínas de miocilina y Wnt que actúan a través de un mecanismo independiente de b-catenina (Kwon y Tomarev (2011) J. Cell. Physiol. 226(12):3392-402). Se informó que la señalización de Wnt reducida en células glaucomatosas TM (GTM) se debe a niveles endógenos más altos de sFRP1 (Wang et al. (2008) J. Clin. Invest. 118:1056-64; Lin y Hankenson (2011) J. Cell. Biochem. 112:3491-501). Otro grupo ha demostrado que la vía de señalización de Wnt protege la línea celular retiniana RGC-5 de la presión elevada (Fragoso et al. (2011) Cell. Mol. Neurobiol. 31(1):163-73).

No está claro en la bibliografía si las mutaciones de MYOC glaucomatosas (por ejemplo, P370L o Y437H) tienen algún efecto sobre la señalización de Wnt en la TM. Un informe afirma que el efecto de las mutaciones glaucomatosas de MYOC, que inhiben la secreción de MYOC de la TM, sobre la señalización de Wnt en la TM no es claro, como se mide mediante el ensayo de señalización de Wnt TOP-Flash (Mao et al. (2012) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 53(11):7043-51). Otro grupo ha informado que P370L tuvo un efecto estimulante sobre la

señalización de Wnt en células Caco-2, mostrado por el ensayo de señalización de Wnt TOP-Flash (Shen et al. (2012) PLoS ONE 7(9):e44902).

Por el contrario, los inventores han descubierto que las mutaciones de MYOC (por ejemplo, P370L e Y437H) tienen un efecto inhibitorio sobre la señalización de Wnt en células 293 y TM, como se muestra por el ensayo de señalización de Wnt TOP-Flash, que informa la actividad de beta-catenina.

Para evaluar el efecto de los mutantes MYOC P370L e Y437H sobre la señalización de Wnt, se cotransfectaron células 293T con la construcción indicadora TOP-Flash y plásmidos wtMYOC ("MYOC"), MYOC P370L o MYOC Y437H. La señalización de Wnt se amplificó después de la adición de Wnt3a de ratón recombinante (400 ng/ml) y se midió mediante ensayo TOP-Flash. La actividad luciferasa (media $\pm$ DE, n = 4) se midió después de la transfección y se normalizó al control de transfección del nivel de luciferasa *Renilla* expresado constitutivamente.

Como se muestra en la **FIG. 3**, la estimulación de células 293T con Wnt3 de ratón recombinante provocó un aumento en el indicador TOP-Flash. La expresión de MYOC natural no interfirió con la señalización de Wnt, como se ensayó mediante TOP-Flash. Sin embargo, la coexpresión de MYOC natural con cualquiera de MYOC P370L o MYOC Y437H bloqueó la activación de TOP-Flash en células 293T. Estos resultados indican que la expresión de mutantes de MYOC glaucomatosos (por ejemplo, P370L e Y437H) son capaces de inhibir la señalización de Wnt en células humanas.

Ejemplo 3: Restauración de la señalización Wnt bloqueada por mutaciones glaucomatosas de MYOC (por ejemplo, P370L e Y437H)

El Ejemplo anterior demuestra que los mutantes glaucomatosos de MYOC P370L e Y437H actúan bloqueando la señalización de Wnt en células humanas. Se llevaron a cabo experimentos adicionales para examinar posibles mecanismos mediante los cuales se puede restaurar la señalización de Wnt en células que expresan estos mutantes de MYOC.

R-espondina 3 (RSPO3) es una proteína codificada por el gen RSPO3 que activa la señalización de Wnt, y se examinó si la expresión de RSPO3 era capaz de restaurar la señalización de Wnt tras su inhibición mediante la expresión de MYOC mutante. Para estos experimentos, similar a la **FIG. 3** anterior, las células 293T se cotransfectaron con la construcción indicadora TOP-Flash y plásmidos wtMYOC ("MYOC"), MYOC P370L, MYOC Y437H y/o RSPO3, como se marcaron. La señalización de Wnt se amplificó después de la adición de Wnt3a de ratón recombinante (400 ng/ml) y se midió mediante ensayo TOP-Flash. La actividad luciferasa (media $\pm$ DE, n = 3) se midió después de la transfección y se normalizó al control de transfección del nivel de luciferasa *Renilla* expresado constitutivamente.

Como se muestra en la **FIG. 4**, la expresión de RSPO3 provocó un aumento en la señalización de Wnt, medida mediante TOP-Flash. De manera importante, la coexpresión de RSPO3 y MYOC P370L o MYOC Y437H fue capaz de restaurar la señalización de Wnt, en comparación con la inhibición de la señalización de Wnt observada tras la expresión de MYOC P370L o MYOC Y437H solos. Las células 293T se cotransfectaron con la construcción indicadora TOP-Flash y plásmidos wtMYOC ("MYOC"), MYOC P370L, MYOC Y437H y/o RSPO3, como se marcaron. La señalización de Wnt se amplificó después de la adición de Wnt3a de ratón recombinante (400 ng/ml) y se midió mediante ensayo TOP-Flash. La actividad luciferasa se midió después de la transfección y se normalizó al control de transfección del nivel de luciferasa *Renilla* expresado constitutivamente.

Para evaluar si se observa un efecto similar en células hTM, se cotransfectaron células hTM-T con la construcción indicadora TOP-Flash y plásmidos wtMYOC ("MYOC w.t."), MYOC P370L y/o RSPO3. La actividad de Wnt se midió mediante el ensayo TOP-Flash como se ha descrito anteriormente (la actividad luciferasa se muestra como media $\pm$ DE, n = 3). La **FIG. 5** muestra que la expresión de MYOC P370L provocó una reducción en la señalización de Wnt y fue capaz de reducir la señalización de Wnt en células hTM-T que coexpresan MYOC natural. La expresión de RSPO3 fue capaz de aumentar la señalización de Wnt en células hTM-T que expresan MYOC P370L solo o MYOC P370L en combinación con MYOC natural. Los resultados representados en las **FIG. 4 y 5** indican que la expresión de RSPO3 restaura la señalización de Wnt en células que expresan mutantes glaucomatosos de MYOC, tales como células 293T y hTM-T.

Sorprendentemente, también se ha descubierto que la inhibición de Wnt mediante la expresión de mutantes glaucomatosos de MYOC se invierte silenciando MYOC (por ejemplo, mediante iARN). El efecto del ARNhc de MYOC sobre la expresión de MYOC se evaluó en células 293T. Como se muestra en la **FIG. 6**, el ARNhc de MYOC redujo la expresión de la proteína MYOC en células que expresan MYOC natural, en comparación con el control de ARNhc mezclado. Esta reducción se observó tanto para la MYOC intracelular como secretada.

La **FIG. 7** muestra el efecto del ARNhc de MYOC en células hTM-T. El ARNhc de MYOC redujo la expresión de la proteína MYOC en células hTM-T que coexpresan MYOC natural y mutante P370L. Esta reducción se observó tanto para la MYOC intracelular como secretada. Por el contrario, el ARNhc que se dirige a Grp94 no tuvo efecto sobre la expresión de MYOC. Grp94 es una chaperona molecular que está implicada en el procesamiento y el

transporte de proteínas secretadas, y recientemente se propuso como un terapéutico para pacientes que padecen algunos casos de glaucoma de MYOC debido a que se cree que Grp94 facilita el aclaramiento de mutantes de MYOC (Suntharalingam et al., (2012) J. Biol. Chem. 287(48):40661-9). Los controles de ARNhc mezclados tampoco tuvieron efecto sobre la expresión de MYOC.

Dado que el ARNhc de MYOC afectó a la expresión de MYOC, sus efectos sobre la señalización de Wnt se investigaron a continuación. Como se muestra en la **FIG. 8**, la expresión de MYOC P370L redujo la señalización de Wnt en células 293T. Los controles de ARNhc de Grp94 y ARNhc mezclado fueron incapaces de restaurar la señalización de Wnt inhibida por MYOC P370L. Por el contrario, el ARNhc de MYOC aumentó la señalización de Wnt en células que expresan MYOC P370L hasta niveles aproximadamente naturales (es decir, el nivel de señalización de Wnt observado en células de control que no expresan MYOC P370L, como se mide por TOP-Flash). También se descubrió que la expresión de RSPO3 aumentaba la señalización de Wnt en células que expresaban MYOC P370L, y la expresión de combinación de RSPO3 con iARN de MYOC (por ejemplo, ARNhc) condujo a un aumento sinérgico en la señalización de Wnt en células que expresaban MYOC P370L.

Aunque la inhibición de Grp94 se ha propuesto como un mecanismo para reducir los efectos de los mutantes de MYOC, estos resultados descritos en el presente documento indican que la expresión de ARNhc de RSPO3 y/o MYOC puede ser más eficaz en la desrepresión de la señalización de Wnt en presencia de expresión del mutante de MYOC.

También se examinó el efecto del ARNhc de MYOC sobre la señalización de Wnt en células que expresan MYOC Y437H. Como se muestra en la **FIG. 9**, la expresión de MYOC P370L o Y437H redujo la señalización de Wnt en células 293T. Sin embargo, el ARNhc de MYOC fue capaz de restaurar la señalización de Wnt en células que expresan MYOC P370L o Y437H. Este efecto no se observó tras la expresión de un control de ARNhc mezclado.

En resumen, estos resultados demuestran que la señalización de Wnt bloqueada por mutantes MYOC (por ejemplo, P370L e Y437H) puede restaurarse mediante la expresión de R-espondina 3 (RSPO3) y/o inhibiendo MYOC (por ejemplo, mediante iARN).

Ejemplo 4: AAV2 R471A transduce células de la malla trabecular

Para determinar si las partículas de AAV podían transducir células de la malla trabecular, los vectores de AAV2 que codifican EGFP se encapsidaron en partículas de AAV2 natural de partículas de AAV2 que comprendían una sustitución de aminoácido R471A (numeración basada en VP1). Las partículas víricas se evaluaron *in vitro* tratando células hTM (descritas anteriormente) con EGFP de AAV2 y EGFP de AAV2 R471A. Como se muestra en la **FIG. 10** (paneles izquierdos), EGFP de AAV2 R471A mostró una mayor transducción de células TM en comparación con AAV2 natural. Para evaluar la transducción de células TM *in vivo*, se inyectaron EGFP de AAV2 y EGFP de AAV2 R471A en los ojos de ratones. A continuación, los ratones se sacrificaron y se analizaron para la expresión de EGFP. Como se muestra en la **FIG. 10** (paneles derechos), EGFP de AAV2 R471A mostró una mayor transducción de células TM *in vivo* en comparación con AAV2 natural.

Ejemplo 5: Expresión de RSPO3 o ARNhc de MYOC en modelos animales de glaucoma de miocilina (MYOC)

Los Ejemplos anteriores demuestran que las mutaciones MYOC glaucomatosas (por ejemplo, P370L e Y437H) bloquean la señalización de Wnt, y que esta inhibición de la señalización de Wnt puede invertirse mediante la expresión de R-espondina 3 (RSPO3) o ARNhc de MYOC. Sin desear ceñirse a teoría particular alguna, se cree que las mutaciones de MYOC (por ejemplo, P370L y/o Y437H) pueden efectuar la señalización de Wnt en la TM, modulando de este modo la PIO y contribuyendo a POAG. Los siguientes experimentos prueban si la expresión de R-espondina 3 (RSPO3) o ARNhc de MYOC, administrado a través del vector de AAV2, es capaz de mejorar los síntomas del glaucoma en modelos de ratón de la enfermedad.

Se usa un modelo de ratón de POAG para examinar la eficacia de la administración mediada por AAV de la expresión de R-espondina 3 (RSPO3) y/o ARNhc de MYOC al ojo en el tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC). Por ejemplo, puede usarse un modelo de ratón que expresa MYOC Y437H (véase Zode et al. (2011) J. Clin. Invest. 121(9):3542-53). En este modelo, la MYOC Y437H humana se expresa bajo el control del promotor de CMV en un ratón transgénico. Usando este sistema, MYOC Y437H se expresa en tejidos relacionados con el glaucoma de miocilina (MYOC), tales como la malla trabecular y la esclerótica. Estos ratones presentan una morfología ocular extremadamente normal, pero comienzan a mostrar síntomas similares al glaucoma de miocilina (MYOC) después de tres meses de edad, tales como aumento de la PIO y degeneración axonal progresiva del nervio óptico.

Los transgenes que expresan GFP, RSPO3 de ratón, ARNhc que se dirige a MYOC de ratón (diana de ARNhc de MYOC y secuencia de bucle del plásmido pGIPZ n.º 93; Dharmacon, GE Healthcare) o ARNhc mezclado se clonan en un genoma de AAV2 bajo el control de un promotor híbrido de β -actina de pollo (CBA) del plásmido pCBA(2)-int-BGH, que también contiene la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (Xu, R., et al. (2001) Gene Ther. 8:1323-32). A continuación, el casete de expresión se clona en un vector plasmídico prevírico

pAAVSP70 que contiene repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV2 (Ziegler, R.J., et al. (2004) *Mod. Ther.* 9:231-40). El tamaño total del genoma de AAV resultante en el plásmido sp70.BR/sFLT01 que incluye la región flanqueada por ITR es de 4,6 kb.

Los genomas de AAV2 se encapsidan en cápsides de AAV2 con mutación R471A para permitir la infección de la malla trabecular o cápsides de AAV2 natural para permitir la infección de las células ganglionares de la retina. Los genomas de AAV2 se encapsidan en la cápside natural de AAV2 o R471A usando el enfoque de vector "gutless" usando un método de transfección triple (véase, por ejemplo, Xiao et al. (1998) *J. Virol.*, 3:2224-32). Brevemente, los genes rep y cap se reemplazan por el gen terapéutico y sus elementos reguladores, ambos intercalados entre una repetición terminal invertida (ITR) 5' y 3'. Los genes rep y cap se proporcionan en trans en un plásmido separado, y un tercer plásmido contribuye a los genes auxiliares adenovíricos requeridos. Como alternativa, los genes auxiliares requeridos son proporcionados por un adenovirus deficiente en replicación y/o genes auxiliares adenovíricos que se integran de manera estable en el genoma de la célula hospedadora. Sin desear ceñirse a teoría particular alguna, se postula que las cápsides víricas están completamente ensambladas, y el genoma del vector flanqueado por ITR se inserta entonces en la cápside mediante un poro de la cápside (Myers & Carter (1980) *Virology*, 102:71-82). Las cápsides que contienen genoma se formulan entonces para inyección.

Se cultivan ratones transgénicos que expresan MYOC Y437H humana hasta aproximadamente tres meses de edad y después se asignan aleatoriamente a grupos de tratamiento. Los ratones se anestesian y se inyectan mediante inyección intravítrea o intracameral con vectores AAV que codifican GFP, RSPO3 de ratón, ARNhc dirigido a MYOC de ratón o ARNhc mezclado. En un grupo de tratamiento, para probar los efectos en células ganglionares de la retina, un ratón recibe una inyección de vectores de AAV2 con RSPO3 de ratón que expresa la cápside de AAV2 natural y una inyección de vectores de AAV2 con cápside de AAV2 natural que expresa GFP en el ojo contralateral. En un grupo de tratamiento, para probar los efectos en la malla trabecular, un ratón recibe una inyección de vectores de AAV2 con la cápside de AAV2 R471A que expresa ARNhc que se dirige a MYOC de ratón y una inyección de vectores de AAV2 con la cápside de AAV2 R471A que expresa ARNhc mezclado en el ojo contralateral. En un grupo de tratamiento, un ratón recibe una inyección de una mezcla de vectores de AAV que expresan vectores de RSPO3 y AAV de ratón que expresan ARNhc que se dirige a MYOC de ratón en un ojo y una inyección de vectores de AAV que expresan vectores de GFP y/o AAV que expresan ARNhc mezclado en el ojo contralateral. En un grupo de tratamiento, un ratón recibe una inyección de vectores de AAV que expresan RSPO3 de ratón y que expresan ARNhc que se dirige a MYOC de ratón en un ojo y una inyección de vectores de AAV que expresan GFP y que expresan ARNhc mezclado en el ojo contralateral.

Los ratones se examinan a intervalos regulares después de la inyección para síntomas de glaucoma de miocilina (MYOC), comparando el ojo que recibe tratamiento experimental con el ojo que recibe tratamiento de control. La PIO se mide mediante tonometría (Kim, C.Y., et al. (2007) *Eye (Lond.)* 21(9):1202-9). El espesor de la córnea se mide mediante un paquímetro de ultrasonido (Lively, G.D., et al. (2010) *Physiol. Genomics* 42(2):281-6). El ángulo iridocorneal se evalúa mediante gonioscopia. La función de las células ganglionares de la retina se mide analizando las respuestas de electroretinografía de patrón a estímulos visuales usando electroretinografía de patrón (PERG) (Zode et al. (2011) *J. Clin. Invest.* 121(9):3542-53). Los ratones pueden ser sacrificados y los ojos disecados para otras caracterizaciones fenotípicas. Por ejemplo, el número de células ganglionares de la retina y/o la morfología se evalúan mediante microscopía de inmunofluorescencia y/o microscopía electrónica de transmisión.

Ejemplo 6: Uso de proteínas de la familia RSPO para restaurar la señalización de Wnt bloqueada por mutación glaucomatosa de MYOC

Como se demuestra en el Ejemplo 3, la señalización de Wnt bloqueada por mutantes MYOC (por ejemplo, P370L e Y437H) se puede restaurar mediante la expresión de R-espondina 3 (RSPO3). Para comprender mejor los mecanismos subyacentes a esta restauración de la señalización de Wnt, se examinó la capacidad de diferentes miembros de la familia RSPO y variantes para restaurar la señalización de Wnt.

Las proteínas de la familia RSPO humanas hRSPO1, 2, 3 y 4 comparten una estructura de dominio similar que incluye dominios ricos en Cys similares a furina, un dominio de trombospondina de tipo I y un dominio cargado positivamente carboxiterminal, como se ilustra en las **FIGS. 11 y 12**. Para examinar los dominios funcionales necesarios para la restauración de la señalización de Wnt, se generaron varias variantes truncadas de RSPO3 humana. Las variantes, y los dominios específicos incluidos y excluidos en cada variante, se muestran en las **FIG. 11, 12, 13A y 14**.

Para probar el efecto de las variantes de RSPO3 sobre la señalización de Wnt, se cotransfectaron células 293T con la construcción indicadora TOP-Flash y wtMYOC ("MYOC") o MYOC Y437H, y también se transfectaron con plásmidos RSPO3 de longitud completa o parcial, como se marcaron en la **FIG. 15**. La señalización de WNT se amplificó después de la adición de Wnt3a humana recombinante (400 ng/ml) y se midió mediante ensayo TOP-Flash. La actividad luciferasa (media $\pm$ DE, n = 3) se midió después de la transfección y se normalizó al control de transfección del nivel de luciferasa *Renilla* expresado constitutivamente.

Como se describe en el Ejemplo 3, MYOC Y437H mutante inhibe la señalización de Wnt en células 293T como se mide mediante el ensayo TOP-Flash. La **FIG. 15** muestra el efecto de las diversas variantes truncadas de hRSPO3 sobre la señalización de Wnt en este ensayo. Como se muestra en la **FIG. 15**, todas las formas de hRSPO3 probadas, tanto parciales como de longitud completa, tenían actividad de restauración Wnt con RSPO3 de longitud completa que presentaba una actividad más potente que muchas de las formas truncadas.

Para probar el efecto de diferentes miembros de la familia RSPO sobre la señalización de Wnt, se cotransfectaron células 293T con la construcción indicadora TOP-Flash y wtMYOC ("MYOC") o MYOC Y437H, y también se transfectaron con plásmidos RSPO1, RSPO2 o RSPO4 de longitud completa o parcial, como se marcaron en la **FIG. 16** (véase la **FIG. 12** para la representación de formas truncadas de RSPO1, 2, 3 y 4). La señalización de Wnt se amplificó después de la adición de Wnt3a de ratón recombinante (400 ng/ml) y se midió mediante ensayo TOP-Flash. La actividad luciferasa (media $\pm$ DE, n = 3) se midió después de la transfección y se normalizó al control de transfección del nivel de luciferasa *Renilla* expresado constitutivamente.

Los resultados de estos estudios se muestran en la **FIG. 16**. Estos resultados indican que RSPO1, 2 y 4 de longitud completa y truncada también tenía actividad de restauración de Wnt con RSPO de longitud completa que mostraban una actividad más potente que las formas truncadas. Todos los miembros y formas de la familia RSPO funcionaron con Wnt3a.

SECUENCIAS

Secuencia polipeptídica de RSPO3 (secuencia señal subrayada)

MHLRLISWLFIILNFM EYIGSQNASRGRRRQRRMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCPKRLFFALERIGM
KQIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYLIILGKCLDNCPEGLEANNIIT
MECVSIVHCEVSEWNPWSPCTKKGKTCGFKRGITETRVREIIQHPSAKGNLCPTINETRKCTVQRKKCKQK
GERGKKGRERKRKKPNKGESKEAIPDSKSLESSKEIPEQRENKQQQKKRKVQDKQKSVSVSTVII (SEQ
ID NO:1)

Secuencia polinucleotídica de RSPO3

ATGCACTTGCGACTGATTCTTGGCTTTTATCATTGAACTTTATGGA
ATACATCGGCAGCCAAAACGCCCTCCCGGGGAAGGCCGAGCGAAGAATGC
ATCCTAACGTTAGTCAAGGCTGCCAAGGAGGCTGTGCAACATGCTCAGAT
TACAATGGATGTTTGTTCATGTAAAGCCAGACTATTTTGTCTGTGGAAG
AATTGGCATGAAAGCAGATTGGAGTATGTCTCTCTTCATGTCCAAGTGGAT
ATTATGGAACGATATCCAGATATAAATAAGTGTACAAAATGCAAAGCT
GACTGTGATACCTGTTTCAACAAAAATTTCTGCACAAAATGTAAAAGTGG
ATTTTACTTACACCTTGGAAAGTGCCTTGACAATTGCCAGAAAGGGTTGG
AAGCCAACAACCATACTATGGAGTGTGTGAGTATTGTGCACTGTGAGGTC
AGTGAATGGAATCCTTGGAGTCCATGCACGAAGAAGGGAAAAACATGTGG
CTTCAAAAGAGGGACTGAAACACGGGTCCGAGAAATAATACAGCATCCTT
CAGCAAAAGGGTAACCTGTGTCCCCCAACAATGAGACAAGAAAGTGTACA
GTGCAAAAGGAAGAAGTGTGAGAAGGGAGAACGAGGAAAAAAGGAAGGGA
GAGGAAAAGAAAAAACCTAATAAAGGAGAAAGTAAAGAAGCAATACCTG
ACAGCAAAAGTCTGGAATCCAGCAAAAGAAATCCAGAGCAACGAGAAAAAC
AAACAGCAGCAGAAGAAGCGAAAAAGTCCAAGATAAACAGAAATCGGTATC
AGTCAGCACTGTACTAG (SEQ ID NO:2)

Secuencia polipeptídica de MYOC

MRITCARCCSFGPEMPAVQLLLLA CLVWDVGARTAQRLRKANDQSGRCQYTFVSASPNESSCPEQSQAM
SVIHNLRDSSSTQRLDLEATKARLSSLESLLHQLTLDQAARPQETQEGLORELGLRRERDQLETQREL
ETAYSNLLRDKSVLEEEKKRLRQENENLARRLESSSQEVARLRRGQCPQTRDTARAVPPGSREVSTWNL
DTLAFQELKSELTEVPASRII.KESPSGYLRSQEGDTCGCELVWVGEPITLRTAETITGKYGVWMRDPKPT
YPYTQETTWRIDTVGTDVRQVTEYDLISQFMQGYPSKVHILPRPLESTGAVVYSGSLYFQGAESRTVIRY
ELNTEYVKAKEIPGAGYHGQFPYSWGGYTDIDLAVDEAGLWVYSTD EAKGAVLSKLN PENLELEQT
WEINIRKQSVANAFICGTLTYVSSYTSADATVNFAYDTGTGISKTLTHPKNRYKYSSMIDYNPLEKKLF
AWDNI NMVTYDIKLSKM (SEQ ID NO:3)

Secuencia de ADNc de MYOC

ATGAGGTTCTTCTGTGCACGTTGCTGCAGCTTTGGGCTTGAGATGCCAGCTGTCCAGCTGCTGCTTCT
GGCTGCCTGGTGTGGGATGTGGGGGCCAGGACAGCTCAGCTCAGGAAGGCCAATGACCAGAGTGG
CCGATGCCAGTATACCTTCAGTGTGGCCAGTCCCAATGAATCCAGCTGCCCAGAGCAGAGCCAGGC
CATGTCAGTCATCCATAACTTACAGAGAGACAGCAGCACCCAACGCTTAGACCTGGAGGGCCACCAA
AGCTCGACTCAGCTCCCTGGAGAGCCTCCTCCACCAATTGACCTTGGACCAGGCTGCCAGGCCCCAG
GAGACCCAGGAGGGGCTGCAGAGGGGAGCTGGGCACCCTGAGGCGGGAGCGGGACCAGCTGGAAAC
CCAAACCAGAGAGTTGGAGACTGCCTACAGCAACCTCCTCCGAGACAAGTCAGTTCTGGAGGAAGA
GAAGAAGCGACTAAGGCAAGAAAATGAGAATCTGGCCAGGAGGTTGGAAAGCAGCAGCCAGGAGG
TAGCAAGGCTGAGAAGGGGCCAGTGTCCCCAGACCCGAGACACTGCTCGGGCTGTGCCACCAGGCT
CCAGAGAACTTTCTACGTGGAATTTGGACACTTTGGCCTTCCAGGAACTGAAGTCCGAGCTAACTGA
AGTTCTGCTTCCCGAATTTGAAGGAGAGCCCATCTGGCTATCTCAGGAGTGGAGAGGGAGACAC
CGGATGTGGAGAACTAGTTTGGGTAGGAGAGCCTCTCAGCTGAGAACAGCAGAAAACAATTACTGG
CAAGTATGGTGTGTGGATGCGAGACCCCAAGCCACCTACCCCTACACCCAGGAGACCACGTGGAG
AATCGACACAGTTGGCACGGATGTCCGCCAGGTTTTTGAGTATGACCTCATCAGCCAGTTTATGCAG
GGCTACCTTCTAAGGTTACATACTGCCAGGCACTGGAAAGCACGGGTGCTGTGGTGTACTCGG
GGAGCCTCTATTTCCAGGGCGCTGAGTCCAGAACTGTCATAAGATATGAGCTGAATACCGAGACAG
TGAAGGCTGAGAAGGAAATCCCTGGAGCTGGCTACCACGGACAGTTCCCGTATTCTGGGGTGGCT
ACACGGACATTGACTTGGCTGTGGATGAAGCAGGCTCTGGGTCATTTACAGCACCGATGAGGCCA

AAGGTGCCATTGTCTCTCCAACTGAACCCAGAGAATCTGGAACCTCGAACAACCTGGGAGACAA
ACATCCGTAAGCAGTCAGTCGCAATGCCTTCATCATCTGTGGCACCTTGTACACCGTCAGCAGCTA
CACCTCAGCAGATGCTACCGTCAACTTTGCTTATGACACAGGCACAGGTATCAGCAAGACCCGTGACC
ATCCATTCAAGAACCCTATAAGTACAGCAGCATGATTGACTACAACCCCTGGAGAAGAAGCTC
TTTGCTGGGACAACCTGAACATGGTCACCTATGACATCAAGCTCTCCAAGATGTAG (SEQ ID NO:4)

5 **Secuencias diana de ARNhc de MYOC**

GGCCATGTCAGTCATCCAT (SEQ ID NO:5)

QAMSVIH (SEQ ID NO:6)

10 **Secuencia de bucle de ARNhc**

AATAGTGAAGCCACAGATGTATT (SEQ ID NO:7)

15 **Secuencia polipeptídica de RSP01 (secuencia señal subrayada)**

MRIGLCVVALVLSWTHLTSSRGIKGKRQRRISAEFSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKLFILFRNDRQV
GVCLPSCPFGYFDARNPDMNKCICKIEHCEACFSHNFCTKCKEGLYLHKGRGYPACPEGSSAANGTMEC
SSPAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRRGSEERTRRVLIIAPVGDIIAACSDTKETRRCTVRRVPCPEGQKR
RKGGQGRRENANRNLARKESKEAGAGSRRRKGQQQQQQQGTVGPI.TSAGPA (SEQ ID NO:8)

20 **Secuencia polipeptídica de RSP02 (secuencia señal subrayada)**

MQFRLEFSALHILNCMDYSHCQGNRWRRSKRASYVSNPICKGCLSCSKDNGCSRCQKLFFFLRREGMRQ
YGECLHSCPSGYGHRAPDMNRCARCRIENCDSFCKDFCTKCKVGFYLRGRGCFDECPDGFAPLEETME
C'VEGCEVGHWSEWGTCSRNNRTC'GFKWGLETRTRQIVKKPVKDITLCTIAESRRCKMTMRHCPGGRKTP
KAKEKRNKKKKRKIJERAQEQHSVFI.ATDRANQ (SEQ ID NO:9)

Secuencia polipeptídica de RSP04 (secuencia señal subrayada)

MRAPLCLLLLVAIIAVDMLALNRRKKQVGTGLGGNCTGCHCSEENGCSSTCQQLFLFIRREGIRQYQKCLII
DCPPGYFGIRGQEVNRCKKCGATCESCFSDFCIRCKRQFYLYKGKCLPTCPGTLAHQNTRECCQGECELG
PWGGWSPCTHNGKTCGSAWGLESRVREAGRAGHEEAATCQVLSERKCPQRPCTPERSPGQKKGRKDR
RPRKDRKLDRIIDVRPRQPI.QP (SEQ ID NO:10)

25 **Secuencia polipeptídica de truncamiento 1-135 de RSP01 (secuencia señal subrayada)**

MRIGLCVVALVLSWTHLTSSRGIKGKRQRRISAEFSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKLFILFRNDRQV
GVCLPSCPFGYFDARNPDMNKCICKIEHCEACFSHNFCTKCKEGLYLHKGRGYPACPEGSSA (SEQ ID
NO:11)

30 **Secuencia polipeptídica de truncamiento 1-206 de RSP01 (secuencia señal subrayada)**

MRLGLCVVALVLSWTHLTSSRGJGKGRQRRISAEGSQACAKGCFI.CSEVNGCLKCSPKLFILERNDIRQV
GVCLPSCPPGYFDARNPDMNKCICKIEHCEACTSHNFTCKCKEGLYLHKGRGYPACPEGSSAANGTMEC
SSPAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRGSEERTRRVLIIAPVGDIIAACSDTKETRRCTVRRVPC (SEQ ID
NO:12)

Secuencia polipeptídica de truncamiento 1-134 de RSPO2 (secuencia señal subrayada)

MQFRLESEFALHILNCMDYSHCQGNRWRRSKRASVYVSNPICKGCLSCSKDNGCSRCQQKLFFFLRREGMRQ
YGFCLHSCPSGYYGHRAPDMNRCARCRIENCDSFCKDFCTCKKVGFYLIHRGRCFDFCPDGFAP (SEQ ID
NO:13)

Secuencia polipeptídica de truncamiento 1-203 de RSPO2 (secuencia señal subrayada)

MQFRLESEFALHILNCMDYSHCQGNRWRRSKRASVYVSNPICKGCLSCSKDNGCSRCQQKLFFFLRREGMRQ
YGFCLHSCPSGYYGHRAPDMNRCARCRIENCDSFCKDFCTCKKVGFYLIHRGRCTDFCPDGFAPLEETME
CVEGCEVGHWSWGTCSRNNRTCGFKWGLETRTRQIVKKPVKDTILCPTIAESRRCKMTMRHC (SEQ ID
NO:14)

Secuencia polipeptídica de truncamiento 1-135 de RSPO3 (secuencia señal subrayada)

MHLRLISWLFHILNFMMEYIGSQNASRGRQRMMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCPKRFFALERIGMK
QIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYLIHLGKCLDNCPEGLEA (SEQ ID
NO:15)

Secuencia polipeptídica de truncamiento 1-146 de RSPO3 (secuencia señal subrayada)

MHLRLISWLFHILNFMMEYIGSQNASRGRQRMMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCPKRFFALERIGMK
QIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYLIHLGKCLDNCPEGLEANNHTME
CVSIV (SEQ ID NO:16)

Secuencia polipeptídica de truncamiento 1-206 de RSPO3 (secuencia señal subrayada)

MHLRLISWLFHILNFMMEYIGSQNASRGRQRMMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCPKRFFALERIGMK
QIGVCLSSCPSGYYGTRYPDINKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYLIHLGKCLDNCPEGLEANNHTME
CVSIVIICEVSEWNPWSPCTKKGKTGFKRGTTETRVREIIQIHPSAKGNLCPPTNETRKTQVQRKKC (SEQ ID
NO:17)

Secuencia polipeptídica de truncamiento 1-128 de RSPO4 (secuencia señal subrayada)

MRAPLCLLLLVAHAVDMLALNRRKKQVGTGLGGNCTGCHCSEENGCSSTCQQRFLFIRREGIRQYKGLH
DCPPGYFGIRGQEVNRCKKCGATCESCFSDFCIRCKRQFYLYKGLCLPTCPPGTLA (SEQ ID NO:18)

Secuencia polipeptídica de truncamiento 1-195 de RSPO4 (secuencia señal subrayada)

MRAPLCLLLLVAHAVDMLALNRRKKQVGTGLGGNCTGCHCSEENGCSSTCQQRFLFIRREGIRQYKGLH
DCPPGYFGIRGQEVNRCKKCGATCESCFSDFCIRCKRQFYLYKGLCLPTCPPGTLAHQNTRECQGECELG
PWGGWSPCTTINGKTGSAWGLESRVREAGRAGHEEAATCQVLSERKCPQIRP (SEQ ID NO:19)

Secuencia polinucleotídica de ITR mutada

CACTCCCTCTCTGCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCGGGCTT
TGCCCGGGCG (SEQ ID NO:20)

Cebador de mutagénesis directa de MYOC370L (la sustitución está subrayada)

ACCACGGACAGTTCCIGTATTCTTGGGGTGG (SEQ ID NO:21)

Cebador de mutagénesis inversa de MYOC370L (la sustitución está subrayada)

CCACCCCAAGAATACGGAACTGTCCGTGT (SEQ ID NO:22)

Cebador de mutagénesis directa de MYOCY437H (la sustitución está subrayada)

TCTGTGGCACCTTGCACACCGTCAGCAGC (SEQ ID NO:23)

ES 3 011 359 T3

Cebador de mutagénesis inversa de MYOCY437H (la sustitución está subrayada)
GCTGCTGACGGTGTQCAAGGTGCCACAGA (SEQ ID NO:24)

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) que comprende un vector que codifica R-espondina 1 (RSPO1), R-espondina 2 (RSPO2) o R-espondina 4 (RSPO4) para su uso en un método de tratamiento del glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero, en donde dicho método comprende administrar dicha partícula de rAAV al ojo del mamífero, y en donde RSPO1, RSPO2 o RSPO4 se une operativamente a un promotor, en donde:
 - (i) el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en el ojo del mamífero; y/o
 - (ii) el promotor es capaz de expresar el RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en células de la malla trabecular.
2. La partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho método comprende además la administración de una partícula de rAAV que comprende un vector que codifica una iARN de MYOC que se dirige a la expresión de una miocilina en el mamífero.
3. La partícula de virus adenoasociado recombinante (rAAV) para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el vector codifica además una iARN de MYOC que se dirige a la expresión de una miocilina en el mamífero.
4. La partícula de AAV para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde
 - (i) el glaucoma de miocilina (MYOC) es un glaucoma primario de ángulo abierto (POAG);
 - (ii) el glaucoma de MYOC es la forma juvenil de glaucoma primario de ángulo abierto; y/o
 - (iii) el mamífero es un ser humano, y el glaucoma de MYOC está asociado con una mutación en una miocilina humana que comprende una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas entre E323K, K398R, Q368X, G364V, P370L, D380A, K423E, Y437H e I477S.
5. La partícula de AAV para el uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde
 - (i) al menos 1×10^9 copias del genoma de la partícula de rAAV se administran al mamífero;
 - (ii) la partícula de rAAV se administra mediante inyección intravítrea y/o inyección intracameral;
 - (iii) la partícula de rAAV se administra a más de una ubicación del ojo;
 - (iv) la partícula de rAAV está en una composición farmacéutica.
6. Una partícula de AAV recombinante que comprende un vector de AAV, en donde el vector de AAV comprende ácido nucleico que codifica RSPO1, RSPO2 o RSPO4, y en donde RSPO1, RSPO2 o RSPO4 se une operativamente a un promotor, en donde:
 - (i) el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en el ojo del mamífero; y/o
 - (ii) el promotor es capaz de expresar RSPO1, RSPO2 o RSPO4 en células de la malla trabecular, opcionalmente, en donde el ácido nucleico codifica además un ácido nucleico inhibidor que se dirige a la expresión de una miocilina (MYOC) en un mamífero.
7. La partícula de rAAV para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o la partícula de rAAV de acuerdo con la reivindicación 6, en donde:
 - (i) RSPO1 es una RSPO1 humana o tiene aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con RSPO1 humana, opcionalmente en donde RSPO1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, o SEQ ID NO: 12;
 - (ii) RSPO2 es una RSPO2 humana o tiene aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con RSPO2 humana, opcionalmente en donde RSPO2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 14; o
 - (iii) RSPO4 es una RSPO4 humana o tiene aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con RSPO4 humana, opcionalmente en donde RSPO4 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 19 o una secuencia de aminoácidos que tiene aproximadamente un 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 18, o SEQ ID NO: 19.
8. La partícula de rAAV para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o 7, o la partícula de rAAV de acuerdo con la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en donde el promotor es un promotor híbrido de β -actina de pollo (CBA).
9. La partícula de rAAV para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5 o 7-8, o la partícula de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-8, en donde:
 - (i) la iARN de MYOC se dirige a la secuencia de aminoácidos de MYOC expuesta en SEQ ID NO: 6;
 - (ii) la iARN es un ARNhc de MYOC que comprende la secuencia de bucle de SEQ ID NO: 7; y/o

(iii) la iARN de MYOC se une operativamente a un promotor híbrido de β -actina de pollo (CBA), o un promotor de la ARN polimerasa III.

10. La partícula de rAAV para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o 7-9, o la partícula de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en donde:

(i) la partícula de rAAV comprende una cápside de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6 ShH10, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV bovino, AAV de cabra o AAV de ratón o una cápside de serotipo AAV de los clados A-F;

(ii) la partícula de rAAV comprende un mutante de la cápside de tirosina, un mutante de la cápside de unión a heparina, una cápside de AAV2R471A, una cápside de AAVAV2/2-7m8, una cápside de AAV DJ, una cápside de AAV2 N587A, una cápside de AAV2 E548A, una cápside de AAV2 N708A, una cápside de AAV V708K, una cápside quimérica de AAV1/AAV2 o una cápside de AAV2/HBoV1; y/o

(iii) la partícula de rAAV comprende una cápside de AAV que comprende una sustitución de aminoácidos en una o más de las posiciones R484, R487, K527, K532, R585 o R588, numeración basada en VP1 de AAV2.

11. La partícula de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o 7-10, o la partícula de rAAV de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en donde:

(i) el vector comprende repeticiones terminales invertidas (ITR) de serotipo AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV 12, AAV de cabra, AAV bovino o AAV de ratón; y/o

(ii) el vector comprende ITR de serotipo 2 de AAV, opcionalmente en donde:

(a) la partícula de rAAV comprende una o más ITR y la cápside derivada del mismo serotipo de AAV; o

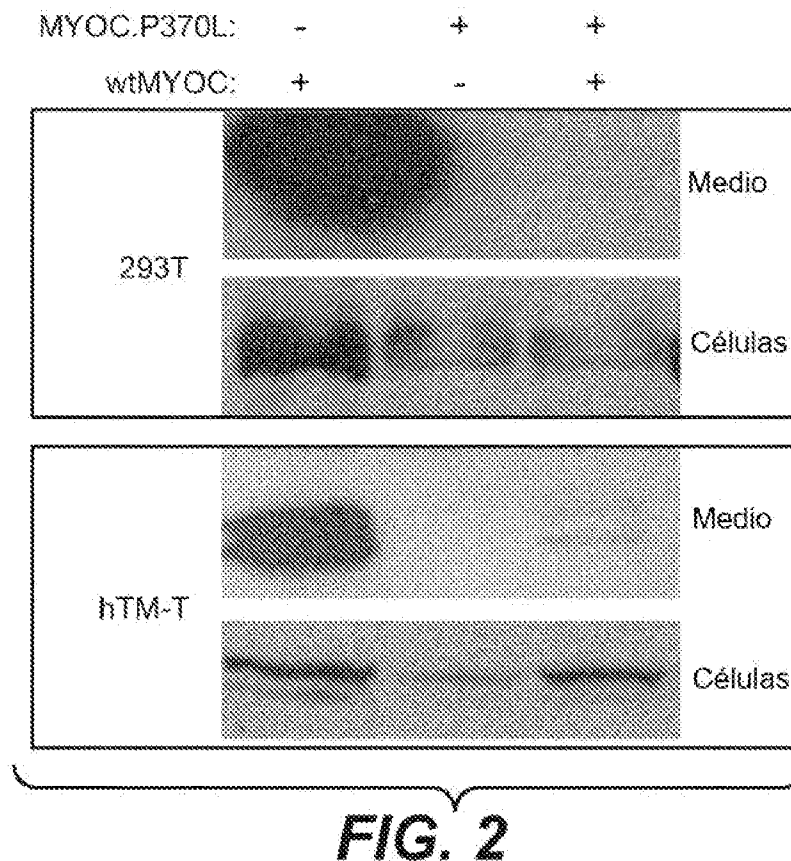
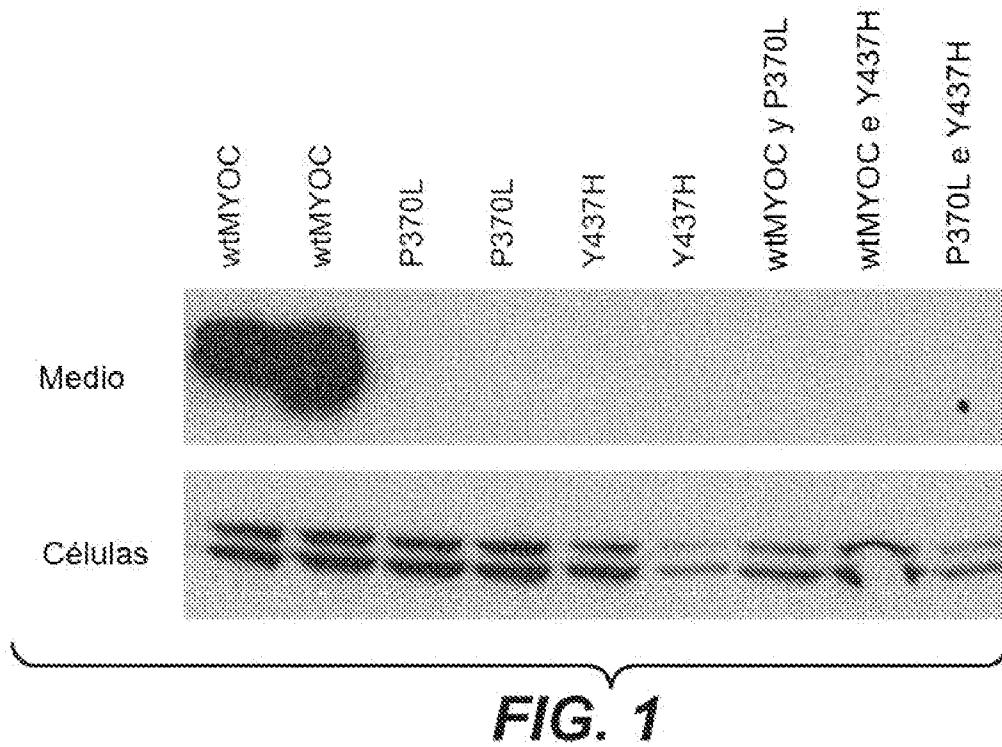
(b) la partícula de rAAV comprende una o más ITR derivadas de un serotipo de AAV diferente de la cápside de las partículas de rAAV.

12. La partícula de rAAV para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, o la partícula de rAAV de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la partícula de rAAV comprende una cápside de serotipo 2 de AAV, y opcionalmente en donde:

(i) la cápside de serotipo 2 de AAV comprende la proteína de la cápside de AAV2 que comprende una sustitución de aminoácido R471A, numeración con respecto a VP1 de AAV2; y/o

(ii) el vector comprende ITR de AAV2.

13. Un kit para tratar glaucoma de miocilina (MYOC) en un mamífero que comprende la partícula de rAAV de una cualquiera de las reivindicaciones 6-12.



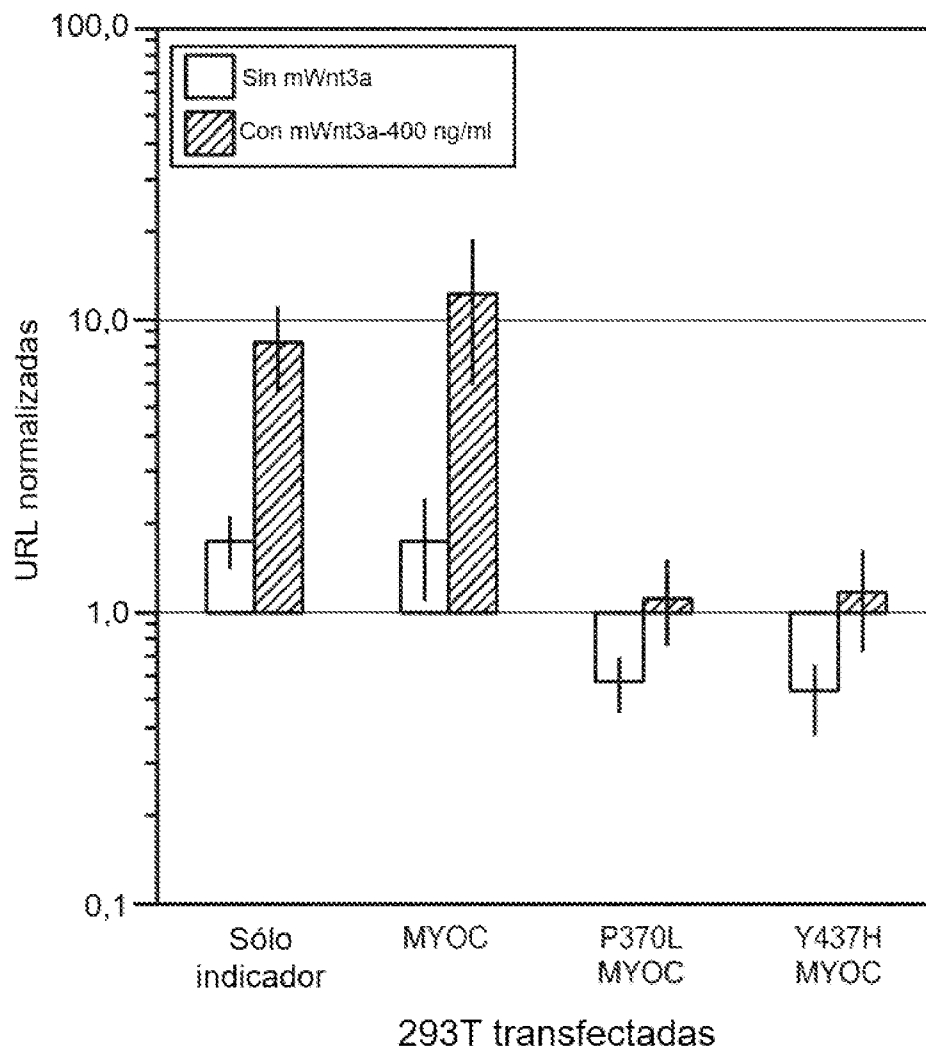


FIG. 3

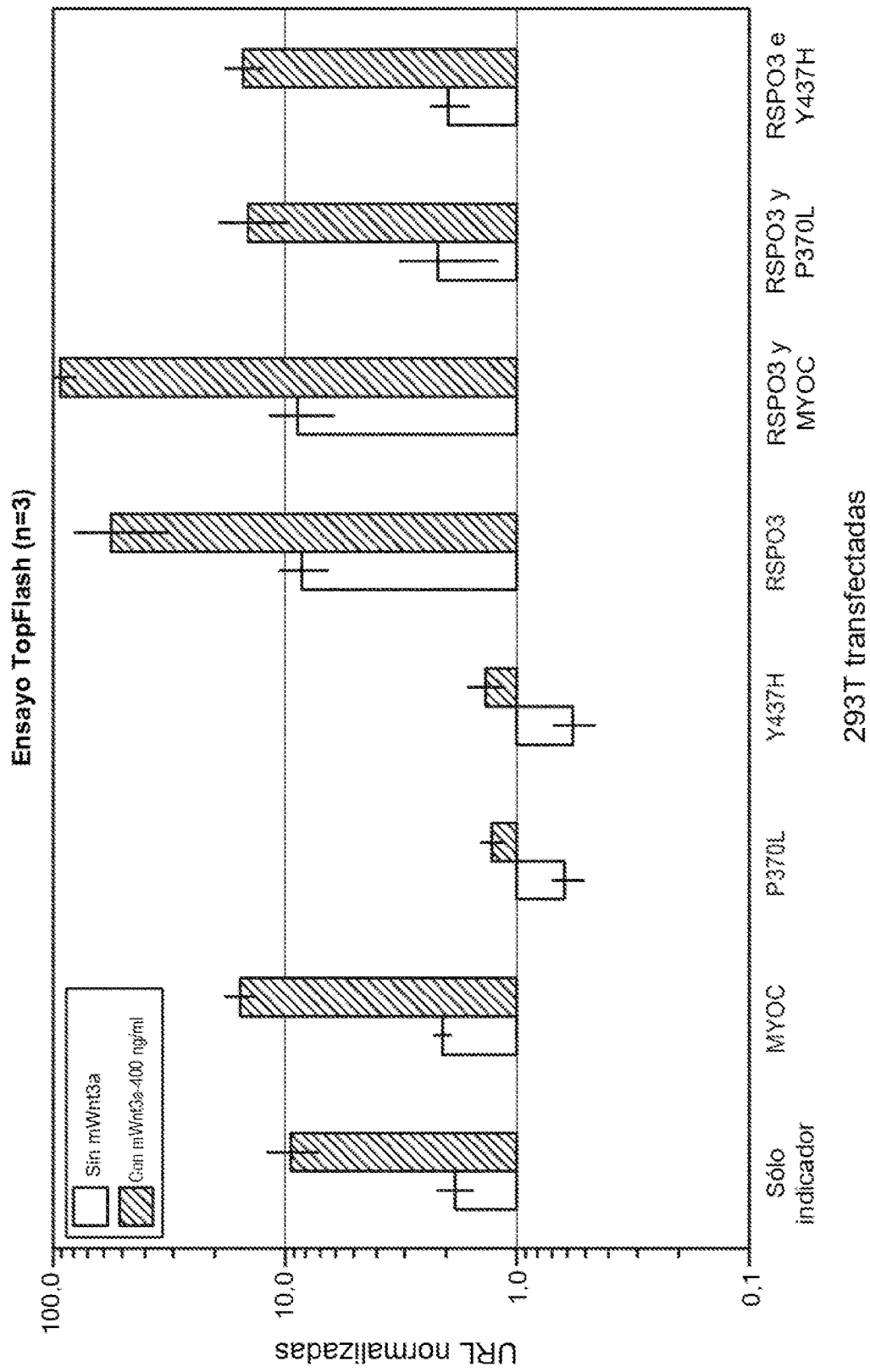


FIG. 4

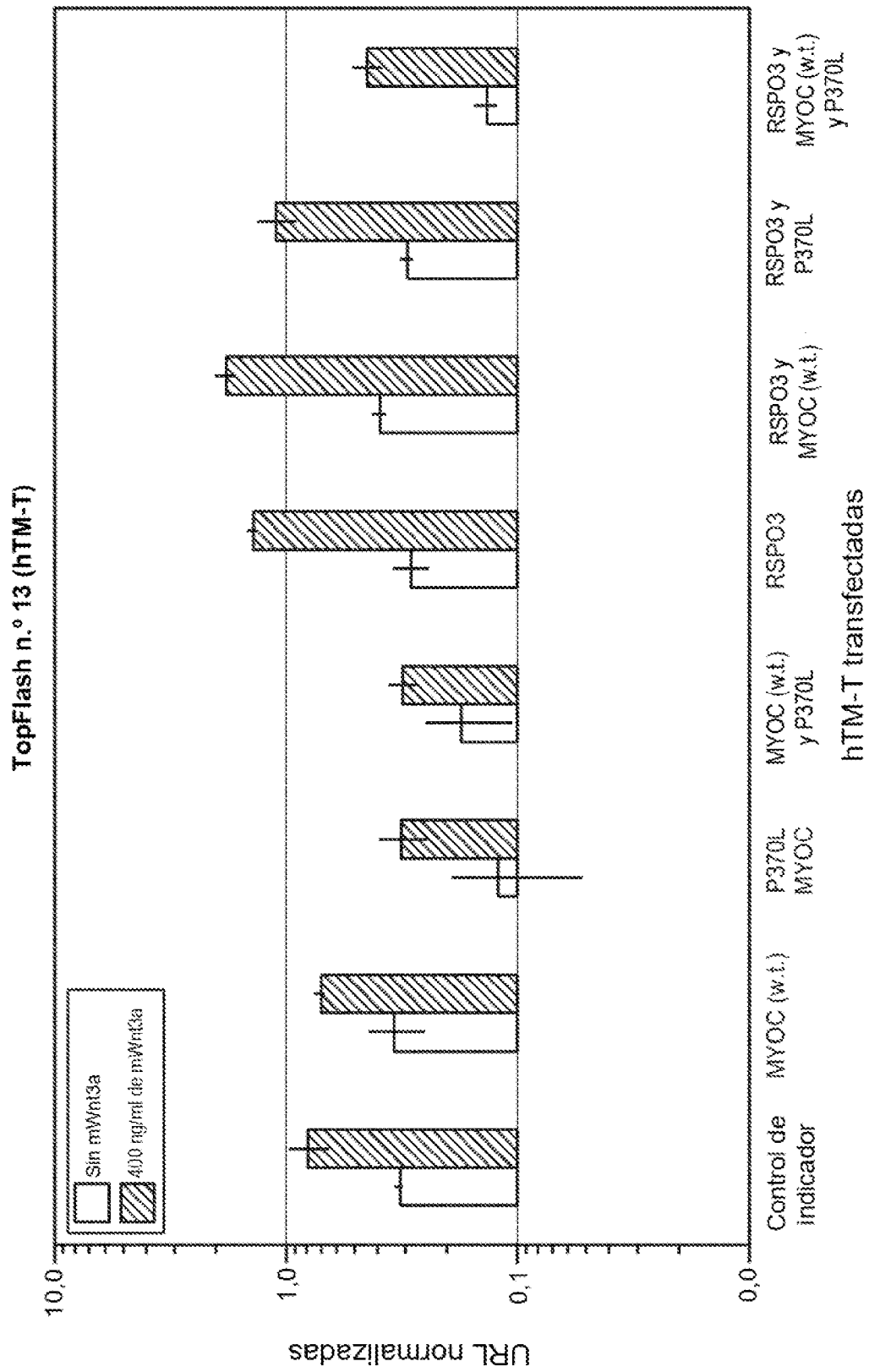


FIG. 5

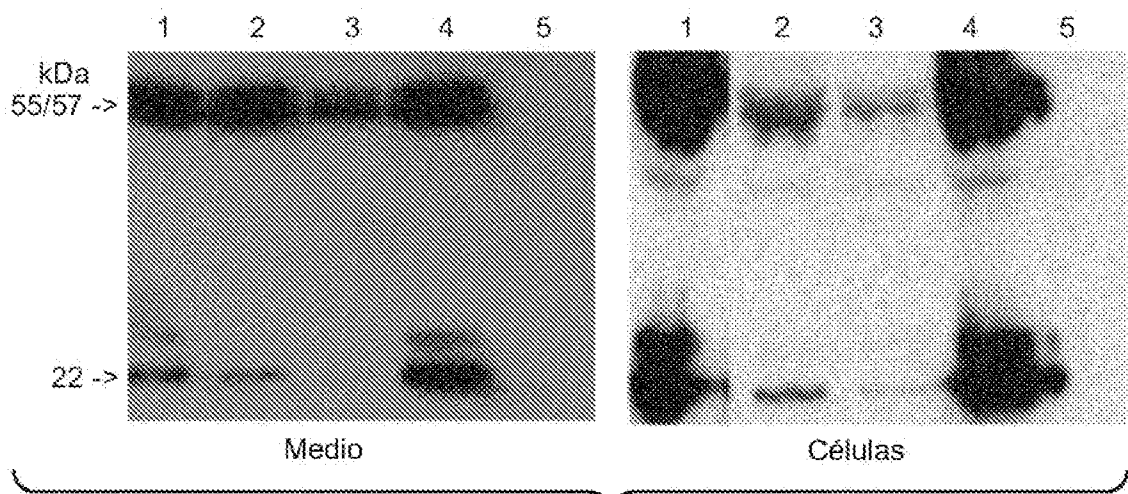


FIG. 6

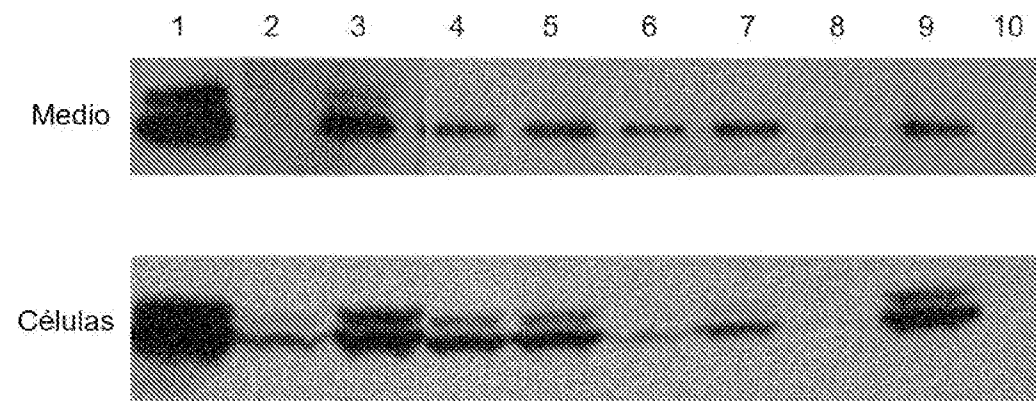
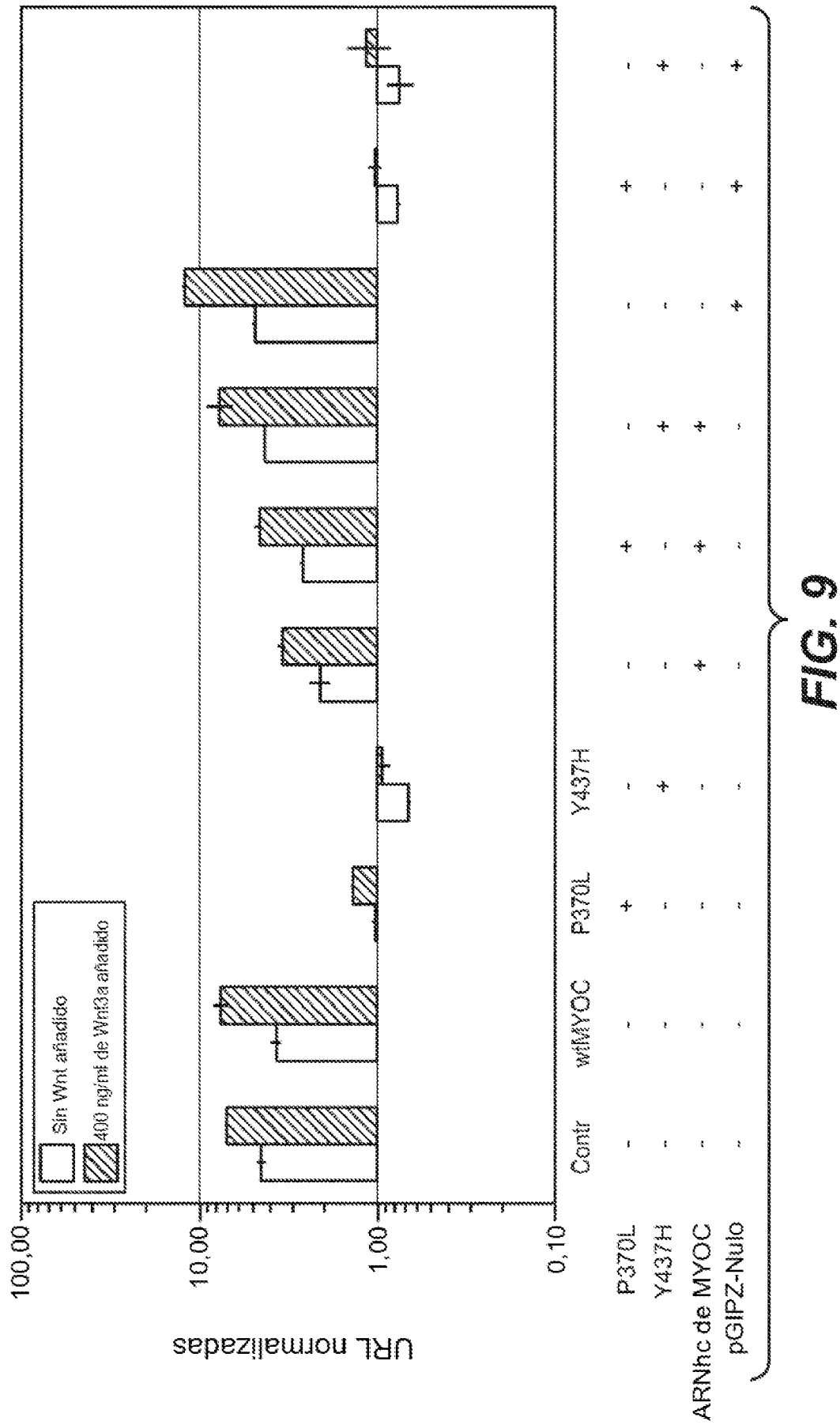


FIG. 7



FIG. 8



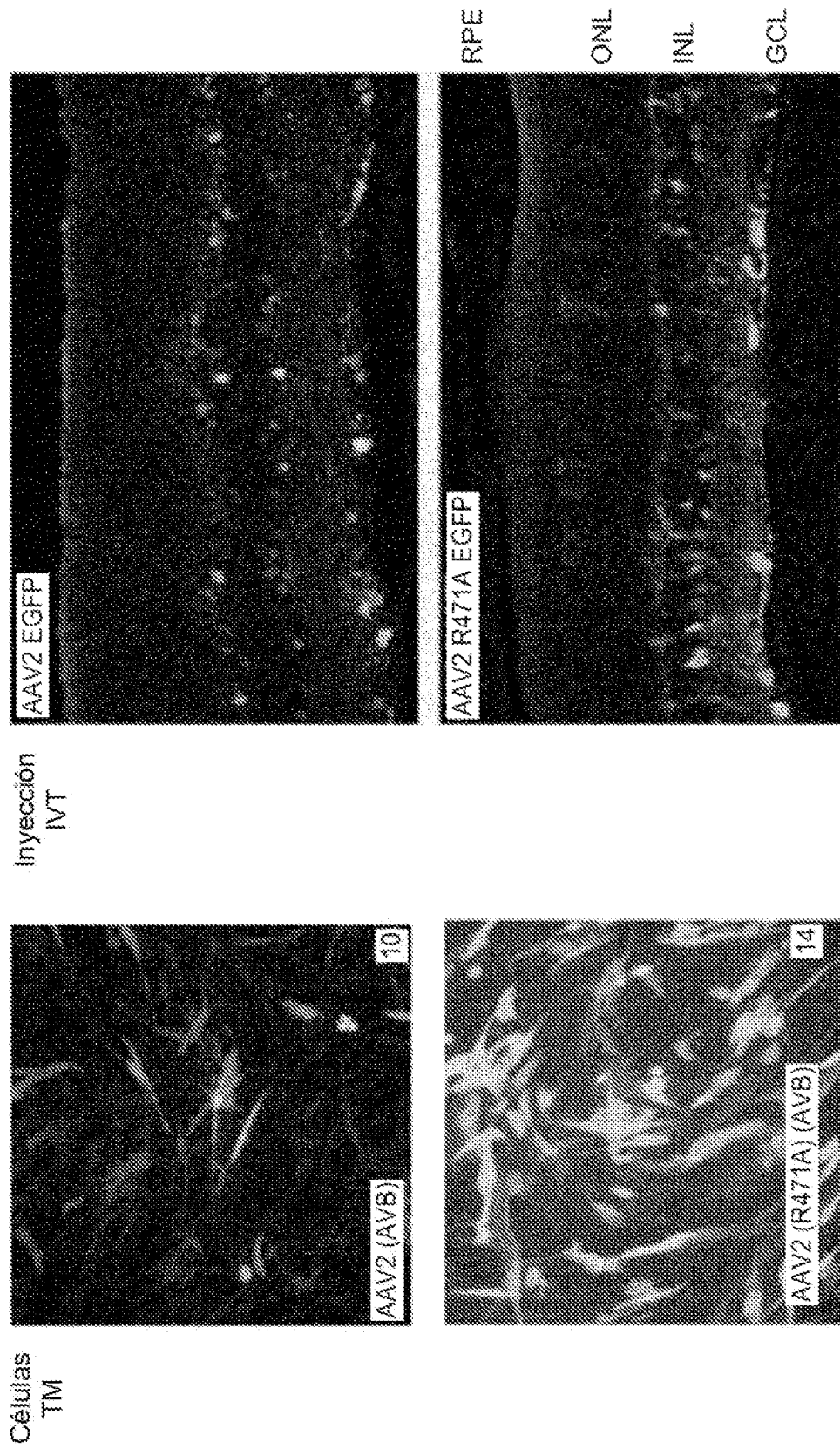


FIG. 10

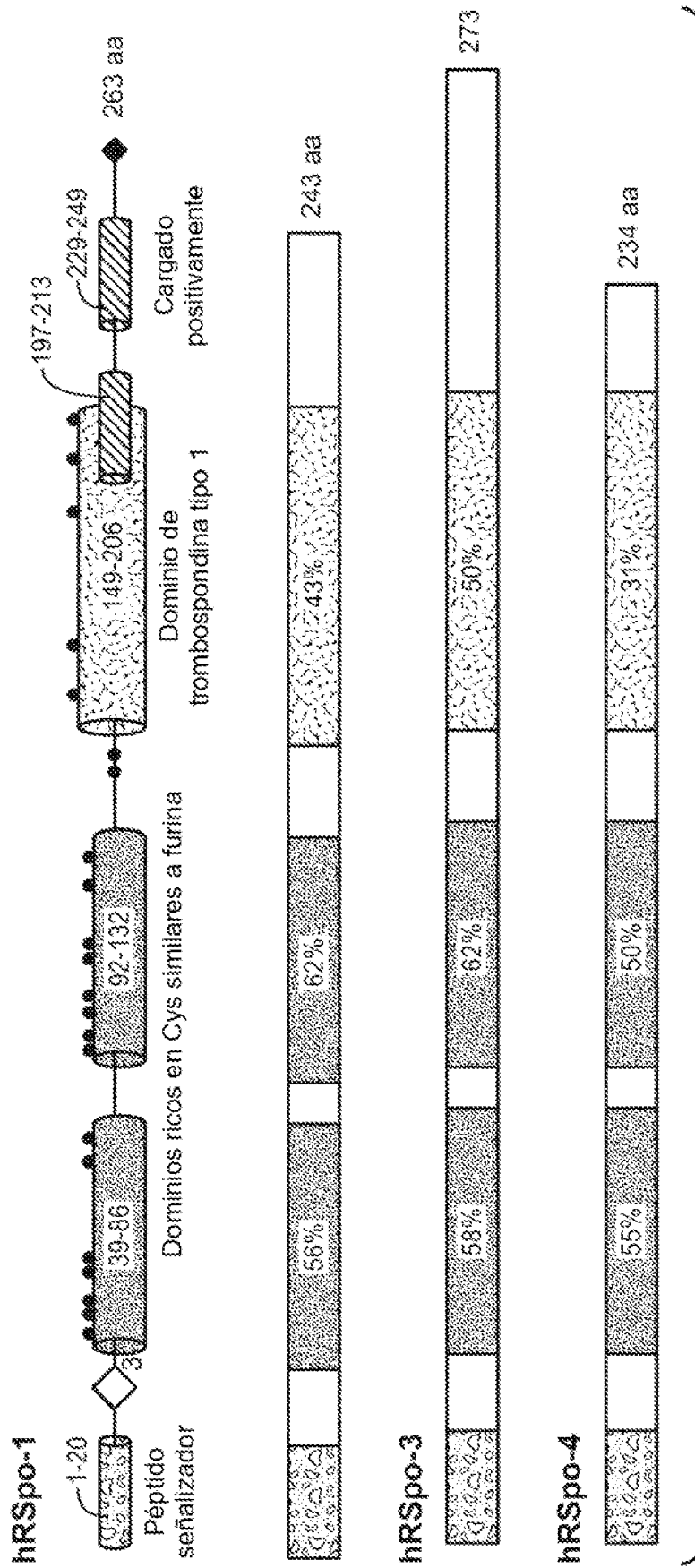
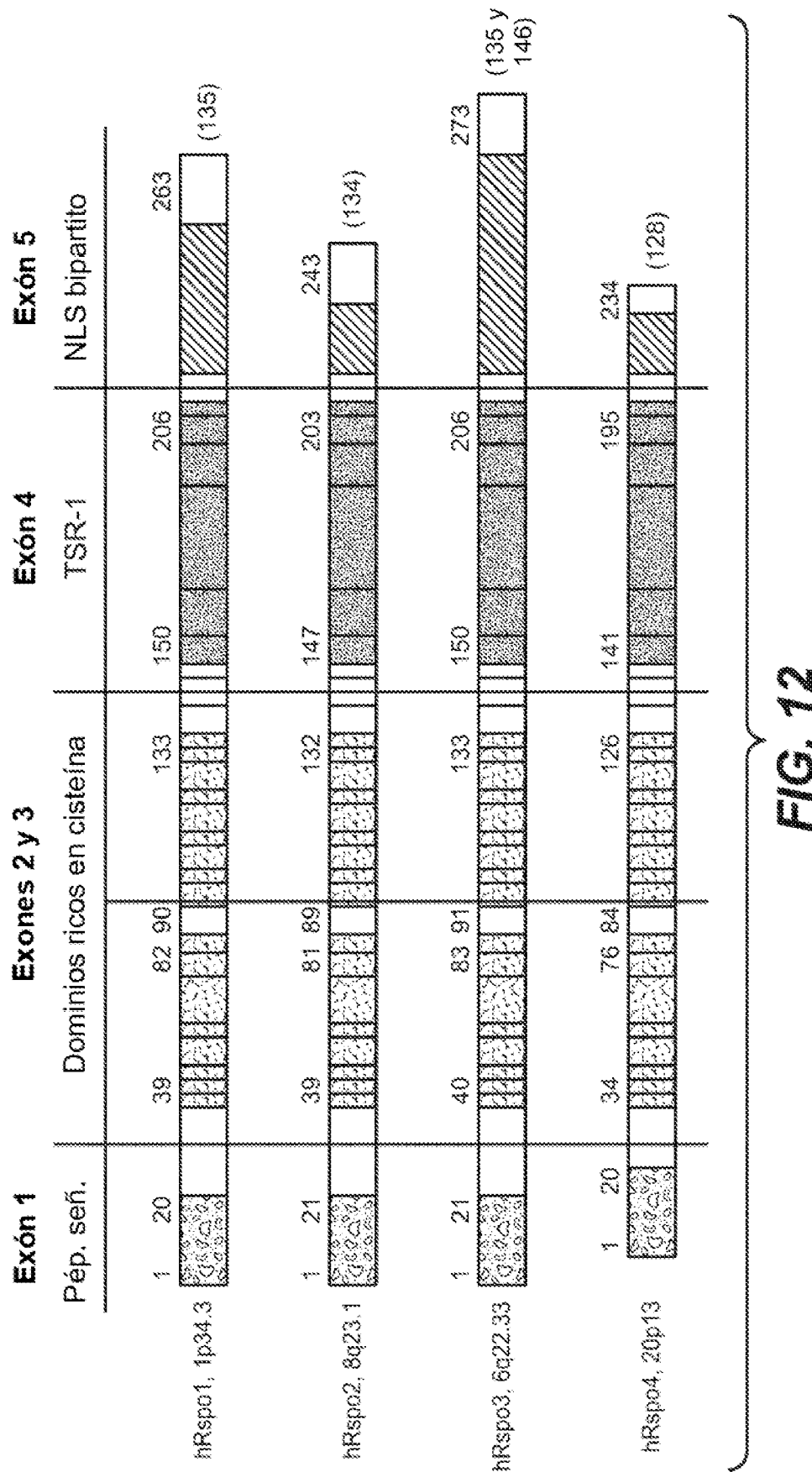


FIG. 11



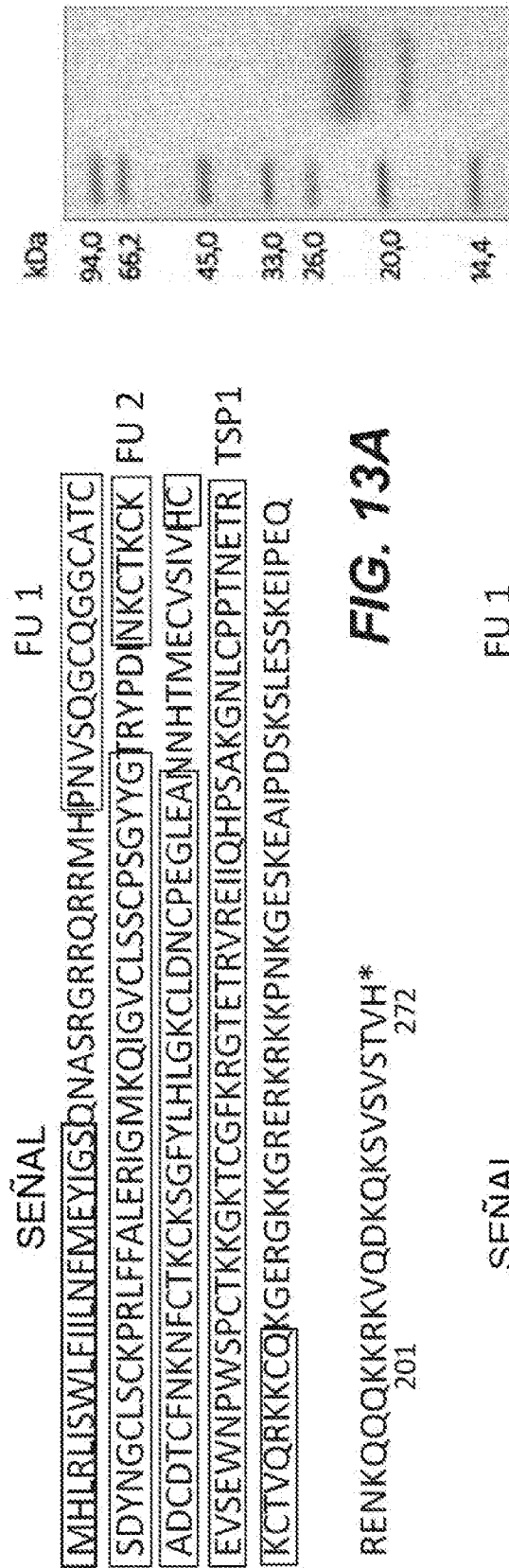


FIG. 13A

FIG. 13D

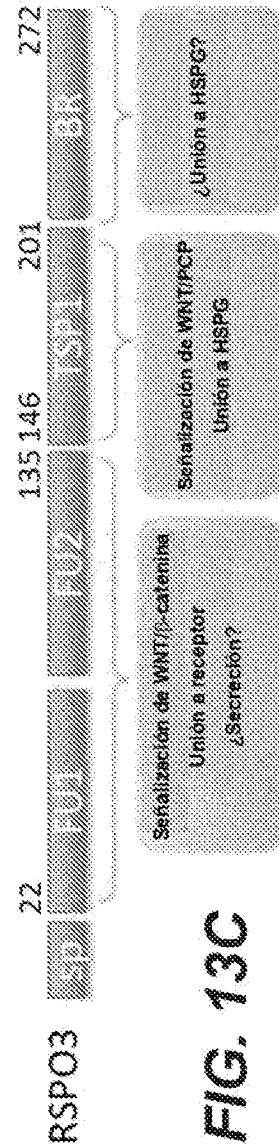
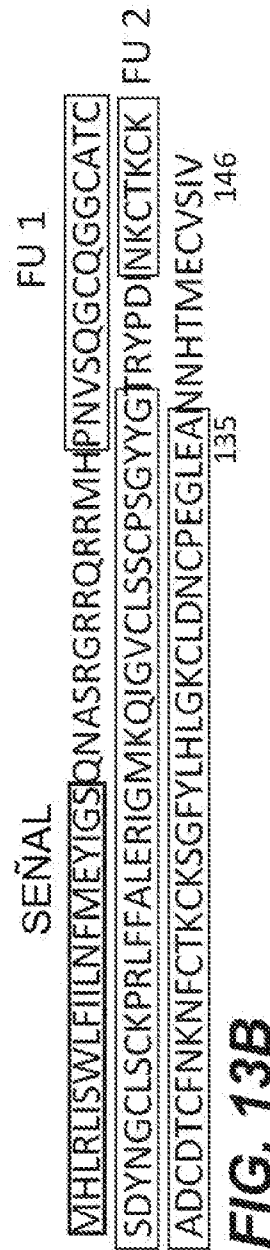


FIG. 13C

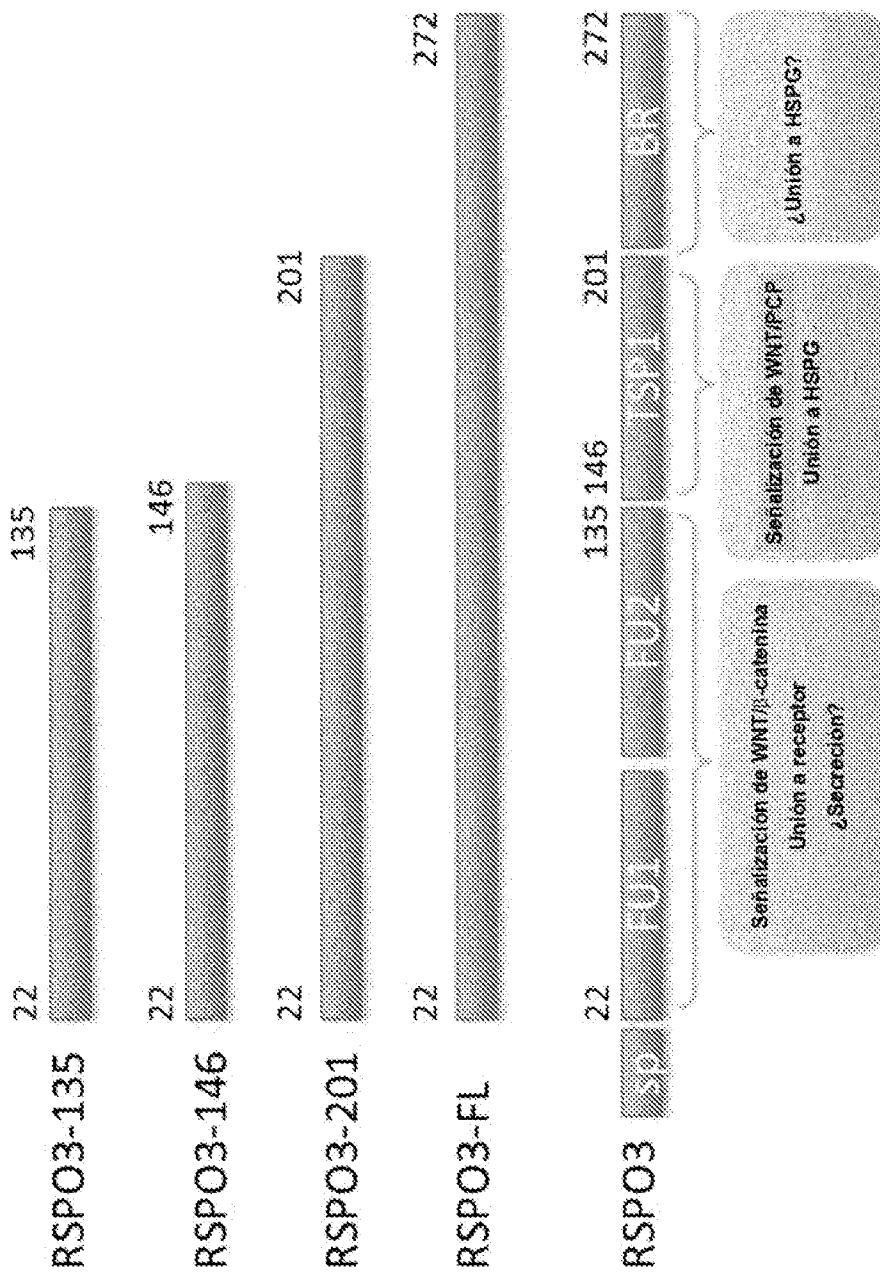


FIG. 14

TopFlash n.º 55b (293T)

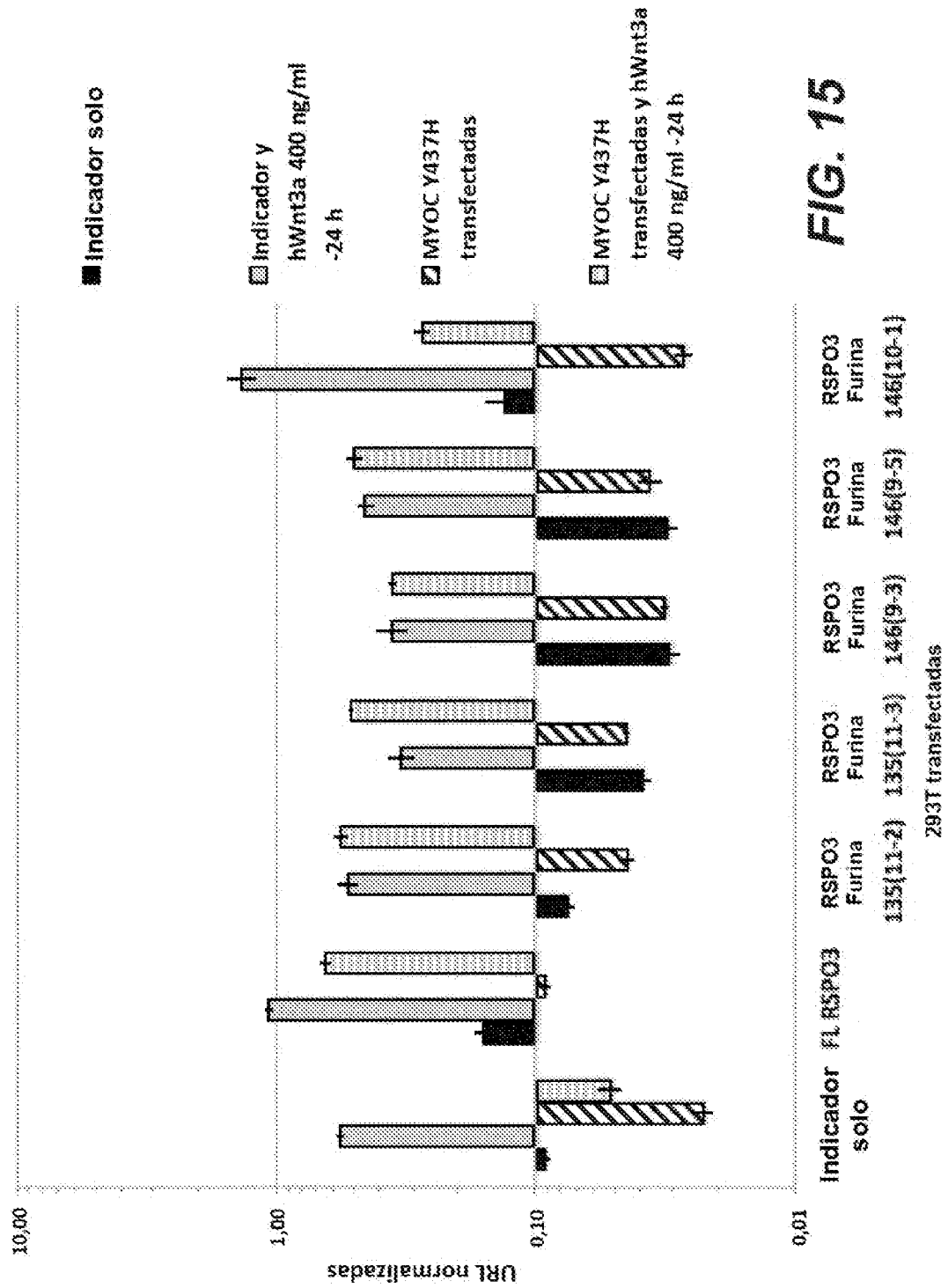


FIG. 15

TopFlash n.º 55a (293T)

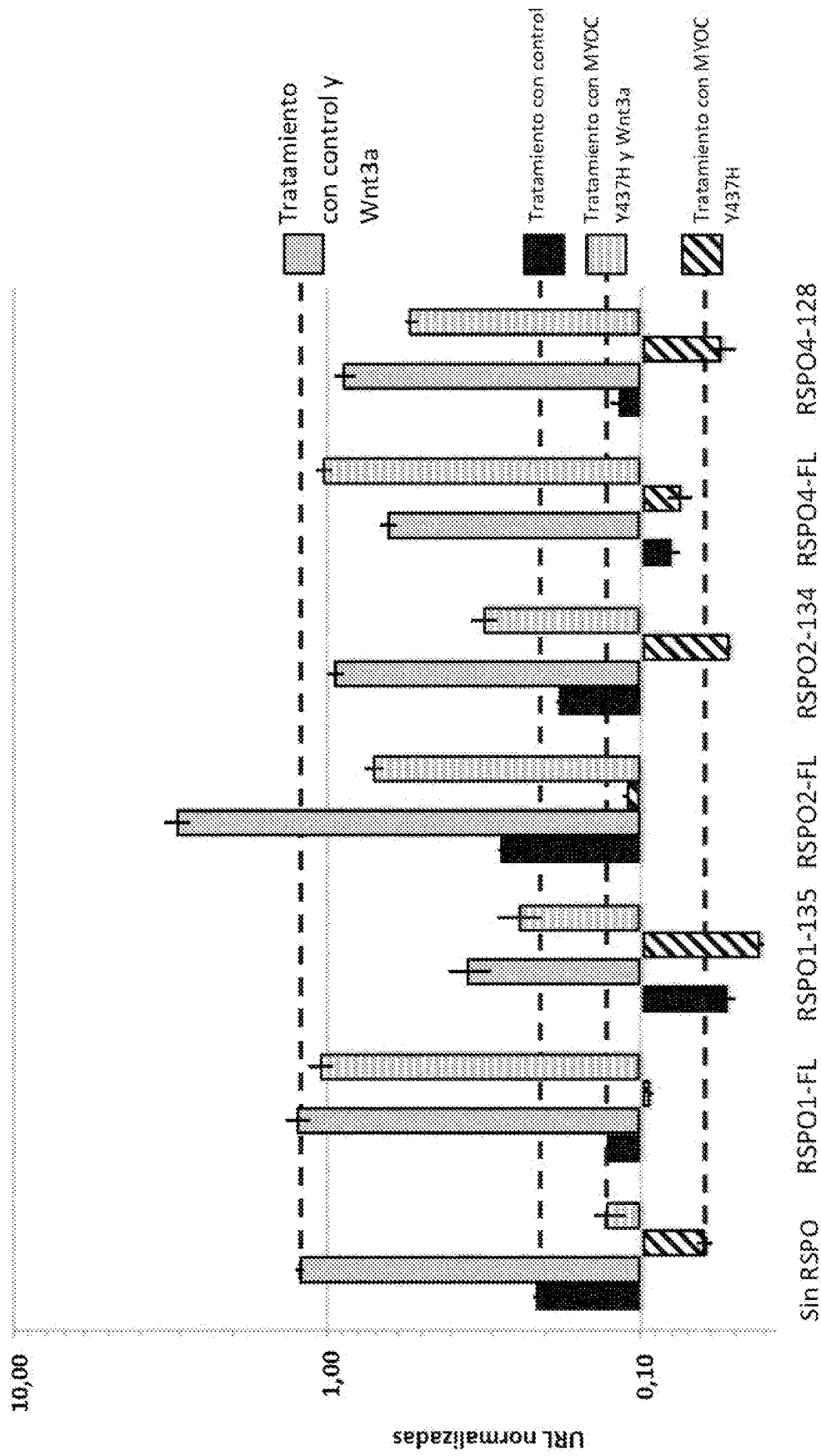


FIG. 16