

TITOLO: "COMPOSIZIONI E METODI PER RIDURRE LA  
NEOVASCOLARIZZAZIONE OCULARE"

\*\* \* \*\*

## Descrizione

### 5 SFONDO DELLA DESCRIZIONE

[0001] Il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) è una proteina segnale prodotta dalle cellule che stimola la vasculogenesi e l'angiogenesi. Il VEGF può essere una parte del sistema che ristabilisce il rifornimento di ossigeno ai tessuti  
10 quando la circolazione del sangue è insufficiente. La funzione normale del VEGF può essere quella di creare nuovi vasi sanguigni durante lo sviluppo embrionale, nuovi vasi sanguigni dopo una lesione, ai muscoli dopo l'esercizio, e nuovi vasi per aggirare i vasi bloccati.

15 [0002] La sovraespressione del VEGF può contribuire a vari stati e condizioni patologici nei mammiferi. L'espressione del VEGF in certi tumori può permettere alle cellule cancerose di crescere e metastatizzare. La sovraespressione del VEGF può causare malattie vascolari nella retina dell'occhio e in altre parti del corpo.

20 [0003] Il VEGF e i recettori del VEGF (VEGFR) sono implicati in una serie di malattie, comprendenti lo sviluppo della neovascolarizzazione coroidea (CNV) e la degenerazione maculare legata all'età. Esempi di malattie oculari o condizioni associate all'attività di VEGF e/o VEGFR includono la degenerazione  
25 maculare neovascolare (umida) legata all'età (DMLE), l'edema

maculare secondario ad occlusione della vena retinica (RVO),  
l'edema maculare diabetico (DME), la retinopatia diabetica (RD)  
in pazienti con DME, la retinopatia ischemica, la  
neovascolarizzazione intraoculare, la DMLE secca, la  
5 neovascolarizzazione retinica, l'ischemia retinica diabetica,  
l'edema retinico diabetico, la retinopatia diabetica  
proliferativa, l'occlusione venosa retinica centrale, e  
l'occlusione venosa retinica di branca.

[0004] Wimmer et al. (2015) "Functional Characterization of AAV-  
10 Expressed Recombinant Anti-VEGF Single-Chain Variable Fragments  
In Vitro", JOURNAL OF OCULAR PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS volume  
31, numero 5, 1, pagine 269-276 riporta i risultati di  
esperimenti in vitro che sono stati eseguiti per determinare se  
le molecole anti-VEGF derivate da ranibizumab possono essere  
15 prodotte in una linea cellulare renale di mammifero dopo un  
trasferimento genico mediato da AAV.

#### **RIASSUNTO DELLA DESCRIZIONE**

[0005] L'invenzione fornisce composizioni farmaceutiche per  
l'uso come definito nelle rivendicazioni allegate. La descrizione  
20 esposta sotto fornisce informazioni tecniche di sfondo e non è  
intesa per definire l'invenzione come tale, ma piuttosto per  
facilitare la comprensione e il funzionamento dell'invenzione  
mentre viene collocata in un contesto tecnico.

[0006] Anche se alcune terapie iniettabili basate su proteine o  
25 anticorpi sono disponibili per il trattamento di DMLE, per

esempio, ranibizumab e bevacizumab, un metodo di terapia genica per il rilascio di un agente anti-VEGF in un occhio può fornire un'opzione di trattamento migliore per i pazienti poiché la terapia genica può fornire un rilascio prolungato o sostenuto  
5 dell'agente terapeutico in vivo senza richiedere iniezioni ripetute, che possono aumentare i rischi di infiammazione, infezione, e di altri effetti avversi in alcuni pazienti. Inoltre, non richiedendo iniezioni ripetute, la terapia genica affronta il problema della conformità e dell'aderenza del  
10 paziente associato a terapie che richiedono iniezioni ripetute, poiché la non conformità può portare alla perdita della vista e al deterioramento della malattia o della condizione dell'occhio. Il tasso di non conformità e non adesione ai regimi di trattamento che richiedono viaggi ripetuti o frequenti agli studi medici per  
15 la somministrazione è superiore tra i pazienti anziani, che sono i più colpiti da DMLE. Rilasciare un agente terapeutico nell'occhio di un paziente tramite terapia genica può quindi fornire un'opzione di trattamento più sicura, potenzialmente più economica, e più comoda per i pazienti, e può migliorare i  
20 risultati dei pazienti affrontando il problema della non conformità e non adesione.

**[0007]** La presente descrizione riguarda composizioni farmaceutiche e metodi di prevenzione o di trattamento della neovascolarizzazione oculare, quali DMLE e CNV, in un soggetto  
25 (per esempio un soggetto umano) mediante la somministrazione

subretinica o intravitreale di una composizione farmaceutica comprendente una quantità farmaceuticamente efficace di un vettore o di particelle virali comprendenti un acido nucleico codificante un agente anti-VEGF, quali sFlt-1, ranibizumab, o  
5 bevacizumab.

**[0008]** In alcuni aspetti, viene qui descritto un metodo per il trattamento di una malattia o di una condizione dell'occhio, il metodo comprendente la somministrazione di una dose unitaria di una sospensione farmaceutica a un soggetto primate per  
10 l'iniezione in un occhio, in cui una dose unitaria della sospensione farmaceutica comprende: i genomi vettoriali da  $1E12$  a  $1E13$  di rAAV aventi una proteina variante del capsido comprendente l'inserimento di una sequenza amminoacidica selezionata tra LGETTRP, NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTR, RAGGSVG, AVDTTKF, e STGKVPN in una posizione che corrisponde agli  
15 amminoacidi 570-611 della proteina del capsido VP1 in AAV2; e una sequenza eterologa codificante un polipeptide del fattore di crescita endoteliale anti-vascolare (anti-VEGF). In alcuni casi, la dose unitaria comprende i genomi vettoriali tra  $2E12$  e  $6E12$ .  
20 In alcuni casi, il soggetto è un primate diverso dall'uomo. In alcuni casi, il soggetto è l'uomo. In alcuni casi, la condizione o la malattia oculare è la degenerazione maculare neovascolare (umida) legata all'età (DMLE), l'edema maculare secondario ad occlusione della vena retinica, l'edema maculare diabetico (DME),  
25 l'occlusione della vena retinica, o la retinopatia diabetica

associata a DME. In alcuni casi, la condizione o la malattia  
oculare è la neovascolarizzazione coroidea o DMLA. In alcuni  
casi, la somministrazione della sospensione porta a una riduzione  
in percentuale delle lesioni di grado IV di almeno il 5% in  
5 confronto a un veicolo di controllo, come misurato dalla  
fotografia a colori del fondo oculare. In alcuni casi, la  
riduzione in percentuale delle lesioni di grado IV è almeno del  
10%. In alcuni casi, la dose unitaria comprende un volume che  
non è superiore a 100 µl. In alcuni casi, la dose unitaria  
10 comprende un volume che non è superiore a 50 µl. In alcuni casi,  
l'inserimento è LGETTRP in una posizione tra gli amminoacidi 587  
e 588 in AAV2. In alcuni casi, il soggetto è sensibile ad almeno  
uno dei ranibizumab, bevacizumab, ed sVEGFR-1. In alcuni casi,  
il soggetto è stato sottoposto a un trattamento precedente con  
15 ranibizumab o bevacizumab. In alcuni esempi, l'iniezione è  
intravitreale. In alcuni esempi, l'iniezione è subretinale. In  
alcuni casi, la somministrazione mediante iniezione avviene non  
più di una volta in almeno 2 anni. In alcuni casi, la  
somministrazione mediante iniezione avviene non più di una volta  
20 in almeno 5 anni. In alcuni casi, la somministrazione è una  
somministrazione singola. In alcuni casi, il metodo comprende  
inoltre l'agitazione della sospensione per garantire una  
distribuzione omogenea prima del passaggio della  
somministrazione. In alcuni casi, il metodo comprende inoltre il  
25 riscaldamento della sospensione a temperatura ambiente prima del

passaggio della somministrazione. In alcuni casi, la sospensione comprende inoltre un tensioattivo. In alcuni casi, il tensioattivo viene scelto tra polisorbati, dodecilsolfato di sodio, laurilsolfato di sodio, ossido di laurildimetilammina, 5 alcoli polietossilati, poliossietilensorbitano, ottossinolo, Brij, pluronic, e olio di ricino poliossilico. In alcuni casi, la sospensione comprende inoltre fenolo, mannitolo, sorbitolo, o cloruro di sodio. In alcuni casi, il metodo comprende inoltre la somministrazione di una soluzione antibiotica o di un unguento 10 di atropina solfato dopo l'iniezione. In alcuni casi, la soluzione antibiotica comprende ciprofloxacina. In alcuni casi, il polipeptide anti-VEGF è un anticorpo monoclonale umanizzato. In alcuni casi, il polipeptide anti-VEGF è un frammento anticorpale o Fab. In alcuni casi, l'anticorpo monoclonale 15 umanizzato è ranibizumab o bevacizumab. In alcuni casi, il polipeptide anti-VEGF è una forma solubile, troncata del recettore 1 di VEGF (sVEGFR-1).

**[0009]** In altri aspetti, viene anche descritto qui un metodo per il trattamento di una condizione o di una malattia oculare, il 20 metodo comprendente: l'agitazione di una composizione in sospensione, comprendente: un rAAV avente una proteina variante del capsido comprendente l'inserimento di una sequenza amminoacidica selezionata tra LGETTRP, NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTTR, RAGGSVG, AVDTTKF, e STGKVPN in una posizione 25 che corrisponde agli amminoacidi 570-611 della proteina del

capside VP1 in AAV2; e una sequenza eterologa codificante un polipeptide del fattore di crescita endoteliale anti-vascolare (anti-VEGF); e la somministrazione a un occhio di un soggetto umano della composizione in sospensione mediante iniezione. In  
5 alcuni casi, l'inserimento è LGETTRP tra gli amminoacidi 587 e 588 dell'AAV2. In alcuni casi, il soggetto viene caratterizzato come soggetto sottoposto a un trattamento precedente con ranibizumab o bevacizumab. In alcuni casi, il soggetto è sensibile ad almeno uno tra ranibizumab e bevacizumab. In alcuni  
10 casi, il polipeptide anti-VEGF è un anticorpo monoclonale umanizzato. In alcuni casi, il polipeptide anti-VEGF è un frammento anticorpale o Fab. In alcuni casi, l'anticorpo monoclonale umanizzato è ranibizumab o bevacizumab. In alcuni casi, il polipeptide anti-VEGF è una forma solubile, troncata  
15 del recettore 1 di VEGF (sVEGFR-1). In alcuni casi, il volume somministrato al soggetto non è superiore a 50 µl. In alcuni casi, il volume somministrato al soggetto non è superiore a 100 µl. In alcuni casi, il volume comprende una dose unitaria tra 1E12 e 1E13 genomi vettoriali. In alcuni casi, il volume  
20 comprende una dose unitaria tra 2E12 e 6E12 genomi vettoriali. In alcuni casi, la fase di somministrazione avviene non più di una volta in almeno 2 anni. In alcuni casi, la fase di somministrazione è un'iniezione singola. In alcuni casi, il metodo comprende inoltre saggiare il soggetto per la sensibilità  
25 ad almeno una terapia approvata prima di somministrare la

composizione. In alcuni casi, la terapia approvata comprende ranibizumab e bevacizumab. In alcuni casi, la sospensione comprende un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In alcuni casi, l'eccipiente comprende un tensioattivo o uno stabilizzante.

5 In alcuni casi, il tensioattivo viene scelto tra polisorbati, dodecilsolfato di sodio, laurilsolfato di sodio, ossido di laurildimetilammina, alcoli polietossilati, poliossietilensorbitano, ottossinolo, Brij, pluronic, e olio di ricino poliossilico. In alcuni casi, l'eccipiente

10 farmaceuticamente accettabile comprende fenolo, mannitolo, sorbitolo, o cloruro di sodio. In alcuni casi, la condizione o la malattia oculare è la degenerazione maculare neovascolare (umida) legata all'età (DMLA), l'edema maculare secondario ad occlusione della vena retinica, l'edema maculare diabetico (DME),

15 l'occlusione della vena retinica, o la retinopatia diabetica associata a DME. In alcuni casi, la condizione o la malattia oculare è la neovascolarizzazione coroidea o la DMLA. In alcuni casi, l'iniezione è intravitreale. In alcuni esempi, l'iniezione è subretinale. In alcuni casi, l'inserimento è LGETTRP in una

20 posizione tra gli amminoacidi 587 e 588 in AAV2. In alcuni casi, il metodo comprende inoltre il riscaldamento della sospensione a temperatura ambiente prima della somministrazione.

[0010] In altri aspetti, viene descritta qui anche una composizione farmaceutica comprendente una dose unitaria di una

25 sospensione, comprendente: un rAAV avente una proteina variante

del capsid e comprendente l'inserimento di una sequenza  
amminoacidica selezionata tra LGETTRP, NETITRP, KAGQANN,  
KDPKTTN, KDTDTTR, RAGGSVG, AVDTTKF, e STGKVPN in una posizione  
che corrisponde agli amminoacidi 570-611 della proteina del  
5 capsid VP1 in AAV2; e una sequenza eterologa codificante un  
polipeptide del fattore di crescita endoteliale anti-vascolare  
(anti-VEGF). In alcuni casi, la dose unitaria è tra 1E12 e 1E13  
genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria è tra 2E12 e  
6E12 genomi vettoriali. In alcuni casi, la sospensione viene  
10 refrigerata. In alcuni casi, un corredo comprende la composizione  
farmaceutica e una soluzione per diluire la composizione  
farmaceutica. In alcuni casi, la soluzione comprende un tampone,  
un sale, un alcol, un tensioattivo, o qualsiasi loro  
combinazione. In alcuni casi, il corredo comprende inoltre una  
15 siringa. In alcuni casi, il polipeptide anti-VEGF è un anticorpo  
monoclonale umanizzato. In alcuni casi, il polipeptide anti-VEGF  
è un frammento anticorpale o Fab. In alcuni casi, l'anticorpo  
monoclonale umanizzato è ranibizumab o bevacizumab. In alcuni  
casi, il polipeptide anti-VEGF è una forma solubile, troncata  
20 del recettore 1 di VEGF (sVEGFR-1). In alcuni casi, l'inserimento  
è LGETTRP in una posizione tra gli amminoacidi 587 e 588 in AAV2.

#### **BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI**

[0011] Una comprensione migliore delle caratteristiche e dei  
vantaggi della presente invenzione sarà ottenuta con riferimento  
25 alla seguente descrizione dettagliata, in cui vengono utilizzati

i principi dell'invenzione e i disegni allegati di cui:

La **figura 1** illustra la neovascolarizzazione coroidea (CNV) indotta da laser in un modello di primate diverso dall'uomo (scimmie verdi africane). Sono state indotte nove lesioni da una  
5 singola applicazione laser utilizzando un'irradiazione con laser di 750 mW, 50  $\mu$ m, 100 ms per tutte le macchie tranne la macchia centrale, che è stata trattata con 400 mW. La fotografia a colori del fondo oculare è stata eseguita immediatamente dopo il trattamento con il laser per documentare le lesioni dal laser.

10 La **figura 2** illustra la sequenza di acidi nucleici di sVEGFR-1.

La **figura 3** illustra la riduzione di CNV dopo l'iniezione intravitreale dell'AAV2,7m8-sVEGFR-1. L'AAV2,7m8-sVEGFR-1 o un veicolo di controllo comprendente un tampone di formulazione sono stati somministrati agli occhi delle scimmie mediante iniezione  
15 intravitreale a una dose di  $2,1 \times 10^{12}$  vg. Una riduzione in percentuale delle lesioni di grado IV di CNV è stata osservata per l'AAV2,7m8-sVEGFR-1, rispetto alla somministrazione del veicolo da solo, dall'immagine del fondo oculare raccolta il giorno 14 (barra di grigio chiaro). Non è stata osservata alcuna  
20 differenza significativa nella percentuale delle lesioni di grado IV di CNV per l'AAV2,7m8-sVEGFR-1, rispetto alla somministrazione del veicolo da solo, come misurato dalle immagini del fondo oculare raccolte il giorno 28 (barra di grigio scuro).

La **figura 4** illustra l'AAV2,7m8-ranibizumab somministrato  
25 intravitrealmente che ha impedito la comparsa di lesioni di grado

IV di CNV indotte da laser. AAV2,7m8-ranibizumab, ranibizumab da solo (controllo positivo), o il veicolo di controllo comprendente un tampone di formulazione sono stati somministrati agli occhi delle scimmie mediante iniezione intravitreale a una dose di  
5  $2 \times 10^{12}$  vg. L'AAV2,7m8-ranibizumab ha ridotto significativamente le lesioni di grado IV di CNV a livelli paragonabili al ranibizumab da solo, come misurato dalle immagini del fondo oculare raccolte il giorno 14 (barra di grigio chiaro) e il giorno 28 (barra di grigio scuro).

10 **DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE**

[0012] Vengono descritti qui sotto diversi aspetti con riferimento a esempi di applicazioni a scopo illustrativo. Dovrebbe essere inteso che numerosi dettagli, relazioni, e metodi specifici vengono esposti a dare una comprensione completa delle  
15 caratteristiche descritte qui. Una persona avente abilità ordinaria nell'arte pertinente, tuttavia, riconoscerà facilmente che le caratteristiche descritte qui possono essere praticate senza uno o più dei dettagli specifici o con altri metodi. Le  
20 caratteristiche descritte qui non sono limitate dalla disposizione illustrata di azioni o eventi, poiché alcune azioni possono avvenire in ordini differenti e/o simultaneamente con altre azioni o eventi. Inoltre, non tutte le azioni o gli eventi illustrati sono necessari per implementare una metodologia secondo le caratteristiche descritte qui.

25 [0013] La presente descrizione riguarda composizioni

farmaceutiche e metodi di trattamento o di prevenzione di  
malattie o condizioni dell'occhio comprendenti la  
somministrazione di una terapia genica, un vettore, o un  
costrutto mediante iniezione intravitreale o subretinale in un  
5 occhio di un primate (per esempio una scimmia o un essere umano)  
comprendente una sequenza nucleotidica (per esempio cDNA) che  
codifica un agente anti-VEGF. A seguito dell'iniezione  
intravitreale o subretinale di una terapia genica, di un vettore,  
o di un costrutto, comprendenti una sequenza nucleotidica che  
10 codifica un agente anti-VEGF o un transgene, il gene anti-VEGF  
viene espresso in vivo in cellule o tessuti bersaglio, per  
esempio, in cellule della retina, per generare una proteina o un  
prodotto genico anti-VEGF per produrre un effetto terapeutico.

**[0014]** In alcuni casi, vengono utilizzati una terapia genica, un  
15 vettore, o un costrutto comprendenti un agente anti-VEGF per  
trattare o prevenire una o più malattie o condizioni dell'occhio,  
comprendenti, ma senza limitazione, la degenerazione maculare  
neovascolare (umida) legata all'età (DMLE), l'occlusione della  
vena retinica (RVO), l'edema maculare secondario ad RVO, l'edema  
20 maculare diabetico (DME), e/o la retinopatia diabetica (RD) in  
pazienti con DME, o qualsiasi altra malattia o condizione oculare  
correlata riguardante la neovascolarizzazione (per esempio la  
neovascolarizzazione coroidea (CNV)) in un soggetto primate o  
umano. In alcuni casi, i metodi descritti qui vengono utilizzati  
25 per trattare una malattia o una condizione dell'occhio che è

sensibile a una terapia di cura standard o un trattamento attuale, per esempio, un'iniezione di ranibizumab o bevacizumab. In alcuni casi, i metodi descritti qui vengono utilizzati per trattare una malattia o una condizione dell'occhio che è  
5 sensibile ad almeno una delle terapie standard attuali, per esempio, un'iniezione di ranibizumab o bevacizumab, per la DMLE, l'RVO, il DME, l'RD, o l'RD in pazienti con DME.

**[0015]** La presente descrizione riguarda composizioni e metodi per la prevenzione o per il trattamento della  
10 neovascolarizzazione oculare in un soggetto (per esempio un primate diverso dall'uomo o l'uomo), mediante la somministrazione subretinica o intravitreale di una composizione farmaceutica adatta per la terapia genica, comprendente una quantità farmaceuticamente efficace di un vettore, per esempio, un vettore  
15 virale quale il virus adenoassociato (AAV), comprendente un acido nucleico codificante un agente anti-VEGF, un transgene terapeutico, o una sequenza nucleotidica che codifica un polipeptide avente almeno il 75%, l'80%, l'81%, l'82%, l'83%, l'84%, l'85%, l'86%, l'87%, l'88%, l'89%, il 90%, il 91%, il 92%,  
20 il 93%, il 94%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99%, o il 100% di omologia a sVEGFR-1, ranibizumab, bevacizumab, o qualsiasi altro agente anti-VEGF noto, o qualsiasi frammento funzionale, mutante, o una loro variante. Tale omologia può essere sulla base  
25 amminoacidica, conformazione spaziale, o struttura della

proteina (per esempio una struttura secondaria, terziaria, o quaternaria).

[0016] In alcuni aspetti, un vettore che viene descritto qui è un virus adenoassociato (AAV) di un qualsiasi sierotipo, 5 comprendente una mutazione, quale un inserimento da 5 a 11 amminoacidi in un sito dell'ansa GH o dell'ansa IV esposta al solvente di una proteina del capsido. In alcuni casi, una sequenza amminoacidica 7-mera viene inserita nell'ansa GH o nell'ansa IV di una proteina del capsido di AAV. Per l'ansa 10 GH/ansa IV del capsido di AAV, si veda, per esempio, van Vliet et al. (2006) Mol. Ther. 14:809; Padron et al. (2005) J.; e Shen et al. (2007) Mol. Ther. 15:1955. In alcuni casi, una sequenza amminoacidica comprendente una qualsiasi delle seguenti: LGETTRP, NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTR, RAGGSVG, AVDTTKF, e 15 STGKVPN viene inserita nell'ansa GH/ansa IV della proteina del capsido di AAV (per esempio la proteina del capsido vp1), creando così varianti di AAV, ciascuna avente una proteina variante del capsido. In alcuni casi, l'inserimento amminoacidico avviene nelle seguenti posizioni di ciascun sierotipo di AAV: tra gli 20 amminoacidi 587 e 588 dell'AAV2, tra gli amminoacidi 590 e 591 dell'AAV1, tra gli amminoacidi 575 e 576 dell'AAV5, tra gli amminoacidi 590 e 591 dell'AAV6, tra gli amminoacidi 589 e 590 dell'AAV7, tra gli amminoacidi 590 e 591 dell'AAV8, tra gli amminoacidi 588 e 589 dell'AAV9, o tra gli amminoacidi 589 e 590 25 dell'AAV10.

[0017] In alcuni casi, gli amminoacidi possono essere inseriti tra due amminoacidi adiacenti in una posizione tra gli amminoacidi 570 e 611 di VP1 dell'AAV2 oppure in una posizione corrispondente di una proteina del capsido di un altro sierotipo di AAV. In alcuni casi, un vettore di AAV2 comprendente l'inserimento amminoacidico LGETTRP tra gli amminoacidi 587 e 588 del VP1 di AAV2 viene utilizzato per la terapia genica descritta qui. In alcuni casi, i metodi di trattamento come descritti qui comprendono la somministrazione subretinica o intravitreale di una composizione o di una formulazione farmaceutica comprendente un AAV di qualsiasi sierotipo comprendente una sequenza nucleotidica codificante un agente anti-VEGF (per esempio sVEGFR-1, ranibizumab, o bevacizumab). In alcuni aspetti, l'iniezione subretinale o intravitreale delle composizioni farmaceutiche descritte qui risulta nell'espressione dell'agente anti-VEGF in cellule bersaglio nell'occhio di un soggetto, per esempio, le cellule della retina, il che porta a una riduzione della neovascolarizzazione o dell'espressione del VEGF e/o a un'inibizione dell'espressione o dell'attività del VEGF in vivo, oppure a un'interruzione dell'interazione VEGF-VEGFR in vivo. In alcuni esempi, l'espressione dell'agente anti-VEGF sequestra il VEGF endogeno in vivo per impedire il legame del VEGF o l'interazione con recettori endogeni del VEGF in vivo.

[0018] Un vantaggio della terapia genica rispetto alle iniezioni

proteiche è che la terapia genica fornisce un rilascio prolungato o continuato di un agente terapeutico (per esempio un agente anti-VEGF) e non richiede iniezioni ripetute. Questo rilascio prolungato o sostenuto dell'agente terapeutico risulta dal  
5 rilascio di una sequenza di acido nucleico che codifica il transgene, che viene espresso in vivo a dare un effetto terapeutico.

**[0019]** In alcuni casi, un rAAV può comprendere una proteina variante del capsido che aumenta la sua infettività nelle cellule  
10 o nel tessuto bersaglio in un occhio (per esempio cellule della retina), permettendo un rilascio maggiormente efficiente della sequenza nucleotidica codificante il transgene terapeutico nelle cellule o nel tessuto bersaglio dove il transgene terapeutico può essere espresso nel corso del tempo, per esempio, per almeno  
15 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, o più anni. La terapia genica come descritta qui può avere come bersaglio un tessuto specifico o un tipo cellulare d'interesse, per esempio, le cellule fotorecetttrici, il che può aiutare a minimizzare gli effetti fuori bersaglio, oppure fornire un rilascio più indirizzato a  
20 bersaglio del transgene terapeutico in vivo.

**[0020]** Con un rilascio prolungato o sostenuto di un agente anti-VEGF in vivo tramite terapia genica, uno sarebbe in grado di somministrare la composizione farmaceutica comprendente una sequenza nucleotidica che codifica l'agente anti-VEGF, in una  
25 dose singola o una dose unica. In alcuni casi, il numero totale

di dosi di una terapia genica somministrato a un soggetto non è più di una volta in almeno 1,5 anni, in almeno 2 anni, almeno 3 anni, almeno 4 anni, almeno 5 anni, almeno 6 anni, almeno 7 anni, almeno 8 anni, almeno 9 anni, o almeno 10 anni. In alcuni casi, la somministrazione di una terapia genica comprendente una sequenza nucleotidica codificante un agente anti-VEGF avviene solo una volta o una volta nella vita di un paziente. In alcuni casi, un'unica somministrazione di una terapia genica comprendente una sequenza nucleotidica codificante un agente anti-VEGF può produrre un effetto terapeutico in un paziente che dura per più di 1 anno, o per più di 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o più anni. In alcuni casi, una terapia genica comprendente una sequenza nucleotidica codificante un agente anti-VEGF viene somministrata non più di una volta a un paziente in almeno 2 o più, almeno 3 o più, almeno 4 o più, almeno 5 o più, almeno 6 o più, almeno 7 o più, almeno 8 o più, almeno 9 o più, o almeno 10 o più anni. In alcuni casi, una terapia genica comprendente una sequenza nucleotidica codificante un agente anti-VEGF viene somministrata a un paziente che è sensibile ad almeno una cura attuale standard o almeno una terapia esistente, per esempio, ranibizumab o bevacizumab. In alcuni casi, la terapia genica viene somministrata a pazienti che hanno ricevuto un pretrattamento con ranibizumab o bevacizumab prima di ricevere la terapia genica.

25 [0021] In alcuni casi, un'unica somministrazione di una terapia

genica comprendente una sequenza nucleotidica codificante un agente anti-VEGF fa evitare al paziente la necessità di ricevere ranibizumab, bevacizumab, o qualsiasi altra sostanza terapeutica a base di proteine o trattamenti standard di cura per la neovascolarizzazione nell'occhio per più di un anno, per più di 1,5 anni, o per più di 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 anni. In alcuni casi, un paziente che riceve un'iniezione di una terapia genica comprendente una sequenza nucleotidica codificante un agente anti-VEGF non richiede ulteriori iniezioni di ranibizumab, bevacizumab, o qualsiasi altra sostanza terapeutica a base di proteine o trattamenti standard di cura per la neovascolarizzazione nell'occhio per il resto della vita del paziente. In altri casi, un paziente che riceve un'iniezione singola di una terapia genica anti-VEGF può cominciare una terapia con ranibizumab, bevacizumab, e/o qualsiasi altra sostanza terapeutica approvata, come richiesto, dopo almeno 1,5, 2,5, 10 o più anni dopo aver ricevuto la terapia genica.

**[0022]** La terminologia della presente descrizione ha lo scopo di descrivere solo casi particolari e non è intesa essere limitante delle composizioni, dei metodi e delle composizioni di questa descrizione.

**[0023]** Le composizioni e i metodi di questa descrizione, come descritti qui, possono impiegare, se non indicato diversamente, tecniche e descrizioni convenzionali di biologia molecolare (che comprendono le tecniche ricombinanti), biologia cellulare,



biochimica, immunochimica e tecniche oftalmiche, le quali rientrano nell'esperienza di quelli che sono esperti nell'arte. Tali tecniche convenzionali includono metodi per osservare e analizzare la retina o la vista in un soggetto, la clonazione e la propagazione di un virus ricombinante, la formulazione di una composizione farmaceutica, e la purificazione biochimica e immunochimica. Illustrazioni specifiche di tecniche adatte possono essere ottenute con riferimento agli esempi qui. Tuttavia, procedure convenzionali equivalenti possono, ovviamente, essere altrettanto utilizzate. Tali tecniche e descrizioni convenzionali possono essere trovate in manuali standard di laboratorio quali Green, et al., a cura di, Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (volumi I-IV) (1999); Weiner, et al., a cura di, Genetic Variation: A Laboratory Manual (2007); Dieffenbach, Dveksler, a cura di, PCR Primer: A Laboratory Manual (2003); Bowtell e Sambrook, DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual (2003); Mount, Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis (2004); Sambrook e Russell, Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2006); e Sambrook e Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2002) (tutti da Cold Spring Harbor Laboratory Press); Stryer, L., Biochemistry (quarta edizione) W.H. Freeman, N.Y. (1995); Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" IRL Press, Londra (1984); Nelson e Cox, Lehninger, Principles of Biochemistry, terza edizione, W.H. Freeman Pub., New York (2000);

e Berg et al., Biochemistry, quinta edizione, W.H. Freeman Pub., New York (2002).

**[0024]** In alcuni casi, vengono descritte qui formulazioni farmaceutiche comprendenti: (a) un virione di un virus adenoassociato ricombinante (rAAV2) adattato per la terapia genica comprendente: (i) una proteina variante del capsido di AAV2, in cui la proteina variante del capsido di AAV2 comprende l'inserimento LGETTRP tra le posizioni 587 e 588, e in cui la proteina variante del capsido conferisce un aumento nell'infettività delle cellule della retina rispetto a un virione di AAV che comprende una corrispondente proteina non variante del capsido di AAV2; e (ii) una sequenza di acido nucleico eterologa codificante un agente anti-VEGF; e (b) un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In alcuni casi, il prodotto genico che viene codificato è un polipeptide avente almeno il 75%, l'80%, l'81%, l'82%, l'83%, l'84%, l'85%, l'86%, l'87%, l'88%, l'89%, il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99%, o il 100% di omologia a ranibizumab, bevacizumab, o qualsiasi altro agente anti-VEGF noto.

**[0025]** Vengono inoltre descritti qui metodi per trattare una condizione o una malattia oculare per cui il prodotto genico anti-VEGF (per esempio ranibizumab o bevacizumab) viene indicato o approvato per il trattamento, comprendenti la somministrazione di una composizione farmaceutica adatta per la terapia genica, cioè, rilasciando una sequenza nucleotidica che codifica un

prodotto genico anti-VEGF in vivo, come descritto qui, a un occhio di un soggetto mediante un'iniezione subretinale o intravitreale. In alcuni casi, la terapia genica viene somministrata mediante iniezione intravitreale. In alcuni casi, 5 l'agente anti-VEGF è ranibizumab, bevacizumab, sVEGFR-1, o qualsiasi variante o frammento funzionale di questi.

[0026] Vengono inoltre descritte qui composizioni farmaceutiche comprendenti una terapia genica o un vettore che codifica una proteina di fusione o un polipeptide avente almeno il 75%, l'80%, 10 l'81%, l'82%, l'83%, l'84%, l'85%, l'86%, l'87%, l'88%, l'89%, il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99%, o il 100% di omologia a una proteina anti-VEGF o una proteina di fusione nota (per esempio ranibizumab o bevacizumab), in cui le composizioni farmaceutiche possono essere 15 liofilizzate, o fornite in forma liofilizzata. In alcuni casi, una forma liofilizzata della composizione farmaceutica viene fornita in un corredo con una soluzione o un tampone per ricostituire la composizione farmaceutica prima della somministrazione. In alcuni casi, le composizioni farmaceutiche 20 descritte qui vengono fornite come soluzione, soluzione omogenea, sospensione, o sospensione refrigerata.

[0027] Vengono inoltre descritti qui virioni di virus adenoassociati ricombinanti (rAAV) adattati per la terapia genica per ridurre la neovascolarizzazione coroidea comprendenti: (a) 25 una proteina variante del capsido di AAV, in cui la proteina

variante del capsido conferisce un aumento nell'infettività delle cellule della retina rispetto a un virione di AAV che comprende una proteina corrispondente non variante o non modificata del capsido di AAV; (b) una sequenza di acido nucleico eterologa codificante un polipeptide o un transgene terapeutico con un'attività anti-VEGF. In alcuni casi, l'rAAV utilizzato per la terapia genica è l'rAAV2.

**[0028]** Vengono inoltre qui descritti metodi per trattare una condizione o una malattia oculare comprendenti la somministrazione di un virione rAAV adattato per la terapia genica e per il rilascio in vivo di una sequenza di acido nucleico per esprimere un agente anti-VEGF, o una proteina avente un'attività anti-VEGF, come descritto qui, a un occhio di un soggetto umano; in cui il soggetto umano è stato precedentemente diagnosticato con una condizione oculare associata alla neovascolarizzazione. In alcuni casi, la terapia genica viene somministrata a un paziente che è sensibile ad almeno una delle terapie approvate anti-VEGF, per esempio, ranibizumab o bevacizumab. In alcuni casi, la terapia genica viene somministrata a un paziente sottoposto precedentemente a un trattamento con almeno una delle terapie approvate, per esempio, ranibizumab o bevacizumab. In alcuni casi, la terapia genica descritta qui viene somministrata a un paziente che è stato pretrattato con almeno una delle terapie approvate, per esempio, iniezioni di ranibizumab o bevacizumab, e che non è riuscito a

mostrare un miglioramento. In alcuni casi, i pazienti che ricevono la terapia genica descritta qui hanno uno o più fattori di rischio che sfavoriscono il trattamento del paziente con terapie che richiedono iniezioni multiple, ripetute a un occhio, per esempio, hanno un aumentato rischio di infiammazione, infezione, pressione intraoculare elevata, e/o altri effetti avversi.

**[0029]** In alcuni casi, vengono qui descritti metodi e formulazioni farmaceutiche comprendenti: (a) un virione di un virus adenoassociato ricombinante (rAAV) adattato per la terapia genica comprendente: (i) una proteina variante del capsido di AAV comprendente un inserimento amminoacidico scelto tra LGETTRP, NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTR, RAGGSVG, AVDTTKF, e STGKVPN in una posizione che corrisponde agli amminoacidi 570-611 della proteina del capsido VP1 in AAV2, e in cui la proteina variante del capsido conferisce un aumento nell'infettività di una cellula della retina rispetto a un virione di AAV che comprende una corrispondente proteina non variante del capsido di AAV2; e (ii) una sequenza di acido nucleico eterologa codificante un agente anti-VEGF; e (b) un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In alcuni casi, il prodotto genico che viene codificato è una proteina di fusione, un anticorpo, o un frammento anticorpale. In alcuni casi, un eccipiente farmaceuticamente accettabile comprende un tensioattivo che impedisce l'aggregazione nella composizione farmaceutica descritta qui.

[0030] Se non definiti diversamente, tutti i termini tecnici utilizzati qui hanno lo stesso significato inteso comunemente da una persona esperta nell'arte.

5 [0031] La terminologia utilizzata qui ha lo scopo di descrivere solo casi particolari e non è intesa essere limitante. Come utilizzate qui, le forme singolari "un/uno/una" e "il/lo/la" sono intese includere anche le forme plurali, a meno che il contesto non indichi chiaramente altrimenti. Inoltre, al grado che i termini "comprendente", "include", "avente", "ha", "con", o loro  
10 varianti vengono utilizzati nella descrizione dettagliata e/o nelle rivendicazioni, tali termini vengono intesi essere compresi in modo simile al termine "comprendente". Il termine "comprendente" come utilizzato qui è sinonimo di "includente" o "contenente", ed è inclusivo o aperto.

15 [0032] Qualsiasi riferimento a "oppure" qui è inteso comprendere "e/o" se non specificato diversamente. Come utilizzato qui, il termine "circa" un numero si riferisce a quel numero più o meno il 10% di quel numero. Il termine "circa" un intervallo si riferisce a quell'intervallo meno il 10% del suo valore più basso  
20 e più il 10% del suo valore più alto.

[0033] Il termine "soggetto", "paziente", o "individuo" si riferisce a primati, comprendenti primati diversi dall'uomo, per esempio, scimmie verdi africane e scimmie rhesus, e l'uomo. Nei casi preferiti, il soggetto è un essere umano o un paziente  
25 umano.

[0034] I termini "trattano", "trattare", "trattamento",  
"migliorano" o "migliorare" e altre forme grammaticali  
equivalenti come utilizzate qui, includono alleviare, placare o  
migliorare i sintomi di una malattia o di una condizione,  
5 prevenendo ulteriori sintomi, migliorando o prevenendo la causa  
metabolica sottostante i sintomi, inibendo la malattia o la  
condizione, per esempio, arrestando lo sviluppo della malattia o  
della condizione, mitigando la malattia o la condizione,  
inducendo la regressione della malattia o della condizione,  
10 attenuando una condizione causata dalla malattia o dalla  
condizione, o arrestando i sintomi della malattia o della  
condizione, e sono intesi includere la profilassi. I termini  
includono inoltre ottenere un beneficio terapeutico e/o un  
beneficio profilattico. Con beneficio terapeutico si intende  
15 l'eradicazione o il miglioramento della malattia sottostante che  
viene trattata. Inoltre, un beneficio terapeutico viene ottenuto  
con l'eradicazione o il miglioramento di uno o più dei sintomi  
fisiologici associati alla malattia sottostante in modo tale che  
si osservi un miglioramento nel paziente, nonostante, in alcuni  
20 casi, il paziente risulta ancora affetto dalla malattia  
sottostante. Per un beneficio profilattico, le composizioni  
farmaceutiche vengono somministrate a un paziente a rischio di  
sviluppare una malattia particolare, o a un paziente che riporta  
uno o più dei sintomi fisiologici di una malattia, anche se non  
25 è stata fatta una diagnosi della malattia.

[0035] I termini "somministrano", "somministrare", "somministrazione" e simili, come utilizzati qui, possono riferirsi ai metodi che vengono utilizzati per permettere il rilascio di sostanze terapeutiche o di composizioni farmaceutiche al sito desiderato dell'azione biologica. Questi metodi includono un'iniezione intravitreale o subretinale a un occhio.

[0036] I termini "quantità efficace", "quantità terapeuticamente efficace" o "quantità farmaceuticamente efficace" come utilizzati qui, possono riferirsi a una quantità sufficiente di almeno una composizione farmaceutica o di un composto che viene somministrata e che allevierà di qualche grado uno o più sintomi della malattia o della condizione che viene trattata.

[0037] Il termine "farmaceuticamente accettabile" come utilizzato qui, può riferirsi a un materiale, quale un veicolante o un diluente, che non annulla l'attività biologica o le proprietà di un composto descritto qui, ed è relativamente non tossico (cioè quando il materiale viene somministrato a un individuo non causa effetti biologici indesiderati né tantomeno interagisce in modo dannoso con nessuno dei componenti della composizione in cui è contenuto).

[0038] Il termine "composizione farmaceutica", o semplicemente "composizione" come utilizzato qui, può riferirsi a un composto biologicamente attivo, facoltativamente miscelato con almeno un componente chimico farmaceuticamente accettabile, quale, sebbene non limitato a, veicolanti, stabilizzanti, diluenti, agenti

disperdenti, agenti sospendenti, agenti addensanti, eccipienti e simili.

**[0039]** Un "vettore di AAV" o "vettore rAAV" come utilizzato qui si riferisce a un vettore di un virus adenoassociato (AAV) o un  
5 vettore AAV ricombinante (rAAV) comprendente una sequenza polinucleotidica che non origina dall'AAV (cioè un polinucleotide eterologo all'AAV come sequenza di acidi nucleici che codifica un transgene terapeutico, per esempio, ranibizumab), tipicamente una sequenza d'interesse per la trasformazione genetica di una  
10 cellula. In generale, il polinucleotide eterologo viene fiancheggiato da almeno una, e, in generale, da due sequenze AAV di ripetizioni terminali invertite (ITR). Il termine vettore rAAV comprende sia particelle del vettore rAAV che plasmidi del vettore rAAV. Un vettore rAAV può essere a singolo filamento  
15 (ssAAV) oppure auto-complementare (scAAV).

**[0040]** Un "virus AAV" o una "particella di AAV virale" o una "particella di un vettore rAAV" si riferisce a una particella virale costituita da almeno una proteina del capsido di AAV (tipicamente da tutte le proteine del capsido di un AAV  
20 selvatico) e un vettore polinucleotidico rAAV. Se la particella comprende un polinucleotide eterologo (cioè un polinucleotide diverso da un genoma di AAV selvatico, quale un transgene, da rilasciare a una cellula di mammifero), viene indicata tipicamente come "particella di un vettore rAAV" o semplicemente  
25 un "vettore rAAV". Così, la produzione di una particella di rAAV

comprende necessariamente la produzione del vettore rAAV, poiché tale vettore è contenuto all'interno di una particella di rAAV.

[0041] Il termine "impaccamento" come utilizzato qui si può riferire a una serie di eventi intracellulari che possono risultare all'assemblaggio e all'incapsidazione di una particella di rAAV.

[0042] I geni di AAV "rep" e "cap" si riferiscono a sequenze polinucleotidiche codificanti la replicazione e l'incapsidazione di proteine di virus adenoassociati. I rep e cap di AAV vengono indicati qui come "geni di impaccamento" AAV.

[0043] Il termine "polipeptide" può comprendere sia le proteine presenti in natura che quelle non presenti in natura (per esempio una proteina di fusione), peptidi, frammenti, mutanti, derivati e analoghi di questi. Un polipeptide può essere monomero, dimerico, trimerico, o polimerico. Inoltre, un polipeptide può comprendere una serie di domini differenti ciascuno dei quali ha una o più attività distinte. A scanso di equivoci, un "polipeptide" può essere di qualsiasi lunghezza maggiore di due amminoacidi.

[0044] Come utilizzato qui, "variante polipeptidica" o semplicemente "variante" si riferisce a un polipeptide la cui sequenza contiene una modificazione amminoacidica. In alcuni esempi, la modifica può essere un inserimento, una duplicazione, una delezione, un riarrangiamento o una sostituzione di uno o più amminoacidi in confronto alla sequenza amminoacidica di una

proteina o di un polipeptide di riferimento, quale una proteina  
nativa o selvatica. Una variante può avere una o più sostituzioni  
puntuali amminoacidiche, in cui un singolo amminoacido in una  
posizione è stato cambiato con un altro amminoacido, una o più  
5 inserzioni e/o delezioni, in cui uno o più amminoacidi vengono  
inseriti o eliminati, rispettivamente, nella sequenza della  
proteina di riferimento, e/o troncamenti della sequenza  
amminoacidica di uno o entrambi i terminali amminici o  
carbossilici. Una variante può avere la stessa o una diversa  
10 attività biologica in confronto alla proteina di riferimento, o  
alla proteina non modificata.

**[0045]** In alcuni casi, una variante può avere, per esempio,  
almeno l'80%, l'81%, l'82%, l'83%, l'84%, l'85%, l'86%, l'87%,  
l'88%, l'89%, il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il 95%, il  
15 96%, il 97%, il 98%, il 99%, o il 100% di omologia di sequenza  
complessiva alla sua proteina di controparte di riferimento, in  
cui la proteina di riferimento può essere presente in natura o  
non presente in natura, o un derivato o una variante di una  
proteina presente in natura. In alcuni casi, una variante può  
20 avere almeno circa il 90% di omologia di sequenza complessiva  
alla proteina selvatica. In alcuni casi, una variante mostra  
almeno circa il 95%, almeno circa il 98%, almeno circa il 99%,  
almeno circa il 99,5% o almeno circa il 99,9% di identità  
complessiva di sequenza.

25 **[0046]** Come utilizzato qui, "ricombinante" può riferirsi a una

biomolecola, per esempio, un gene o una proteina, che (1) è stata rimossa dal suo ambiente dove è presente in natura, (2) non è associata al polinucleotide intero oppure a una sua porzione in cui il gene si trova in natura, (3) è legata operabilmente a un polinucleotide a cui non è legata in natura, o (4) non è presente in natura. Il termine "ricombinante" può essere utilizzato in riferimento a DNA clonati isolati, analoghi polinucleotidici sintetizzati chimicamente, o analoghi polinucleotidici che sono biologicamente sintetizzati da sistemi eterologhi, così come proteine e/o mRNA codificati da tali acidi nucleici. Così, per esempio, una proteina sintetizzata da un microrganismo è ricombinante, per esempio, se è sintetizzata da un mRNA sintetizzato da un gene ricombinante presente nella cellula.

[0047] "Legato operabilmente" o "legato operativamente" o "accoppiato" può riferirsi a una giustapposizione di elementi genetici, in cui gli elementi sono in una relazione che consente a loro di funzionare nel modo atteso. Per esempio, un promotore può essere legato operabilmente a una regione codificante se il promotore aiuta a iniziare la trascrizione della sequenza codificante. Possono esservi residui intermedi tra il promotore e la regione codificante a condizione che questa relazione funzionale sia mantenuta.

[0048] Il termine "vettore di espressione" o "costrutto di espressione" o "cassetta" o "plasmide" o semplicemente "vettore" può includere qualsiasi tipo di costrutto genetico, comprendente

l'AAV o i vettori rAAV, contenenti un acido nucleico o un polinucleotide codificante un prodotto genico in cui parte o tutta la sequenza nucleotidica codificante è in grado di essere trascritta ed è adatta per la terapia genica. Il trascritto può essere tradotto in una proteina. In alcuni casi, può essere parzialmente tradotto o non tradotto. In alcuni aspetti, l'espressione comprende sia la trascrizione che la traduzione di un gene dell'mRNA in un prodotto genico. In altri aspetti, l'espressione comprende solo la trascrizione dell'acido nucleico codificante i geni d'interesse. Un vettore di espressione può anche comprendere elementi di controllo legati operabilmente alla regione codificante per facilitare l'espressione proteica in cellule bersaglio. La combinazione di elementi di controllo e di un gene o di geni a cui sono legati operabilmente per l'espressione può qualche volta essere indicata come "cassetta di espressione", di cui un numero elevato è noto e disponibile nell'arte oppure può essere facilmente costruita da componenti che sono disponibili nell'arte.

**[0049]** Il termine "eterologo" può riferirsi a un'entità che è genotipicamente distinta da quella del resto dell'entità con la quale viene confrontata. Per esempio, un polinucleotide introdotto mediante tecniche di ingegneria genetica, in un plasmide o in un vettore, derivato da una specie differente può essere un polinucleotide eterologo. Un promotore rimosso dalla sua sequenza codificante nativa e legato operabilmente a una

sequenza codificante con la quale non si trova legato naturalmente può essere un promotore eterologo.

[0050] Come utilizzato qui, "7m8" si riferisce alla sequenza amminoacidica 7-mera LGETTRP.

5 [0051] "Variante di 7m8" si riferisce a un rAAV, che può essere di qualsiasi sierotipo, con la sequenza amminoacidica LGETTRP inserita nell'ansa GH esposta al solvente della proteina del capsido.

[0052] Quando la 7m8 viene inserita nell'rAAV2 (indicato anche  
10 come AAV2,7m8), la sequenza amminoacidica 7-mera LGETTRP viene inserita nell'ansa GH della proteina del capsido di AAV2, per esempio, tra le posizioni 587 e 588 della proteina del capsido di AAV2. Quando la 7m8 viene inserita nell'rAAV1 (indicato anche come AAV1,7m8), la sequenza amminoacidica 7-mera LGETTRP viene  
15 inserita nell'ansa GH della proteina del capsido di AAV1, per esempio, tra gli amminoacidi 590 e 591 della proteina del capsido di AAV1. Quando la 7m8 viene inserita nell'rAAV5 (indicato anche come AAV5,7m8), la sequenza amminoacidica 7-mera LGETTRP viene inserita nell'ansa GH della proteina del capsido di AAV5, per  
20 esempio, tra gli amminoacidi 575 e 576 della proteina del capsido di AAV5. Quando la 7m8 viene inserita nell'rAAV6 (indicato anche come AAV6,7m8), la sequenza amminoacidica 7-mera LGETTRP viene inserita nell'ansa GH della proteina del capsido di AAV6, per esempio, tra gli amminoacidi 590 e 591 della proteina del capsido  
25 di AAV6. Quando la 7m8 viene inserita nell'rAAV7 (indicato anche

come AAV7,7m8), la sequenza amminoacidica 7-mera LGETTRP viene inserita nell'ansa GH della proteina del capsido di AAV7, per esempio, tra gli amminoacidi 589 e 590 della proteina del capsido di AAV7. Quando la 7m8 viene inserita nell'rAAV8 (indicato anche  
5 come AAV8,7m8), la sequenza amminoacidica 7-mera LGETTRP viene inserita nell'ansa GH della proteina del capsido di AAV8, per esempio, tra gli amminoacidi 590 e 591 della proteina del capsido di AAV8. Quando la 7m8 viene inserita nell'rAAV9 (indicato anche come AAV9,7m8), la sequenza amminoacidica 7-mera LGETTRP viene  
10 inserita nell'ansa GH della proteina del capsido di AAV9, per esempio, tra gli amminoacidi 588 e 589 della proteina del capsido di AAV9. Quando la 7m8 viene inserita nell'rAAV10 (indicato anche come AAV10,7m8), la sequenza amminoacidica 7-mera LGETTRP viene inserita nell'ansa GH della proteina del capsido di AAV10, per  
15 esempio, tra gli amminoacidi 589 e 590 della proteina del capsido di AAV10.

**[0053]** In alcuni casi, vengono descritti qui virioni di virus adenoassociati ricombinanti (rAAV) per ridurre la neovascolarizzazione comprendenti: (a) una proteina variante del  
20 capsido di AAV, in cui la proteina variante del capsido di AAV comprende una modificazione amminoacidica in una regione esposta al solvente della proteina del capsido e mostra un'aumentata infettività delle cellule retiniche rispetto a una proteina del capsido di AAV corrispondente non variante; e (b) un acido  
25 nucleico eterologo comprendente una sequenza nucleotidica

codificante un prodotto genico o un transgene terapeutico, e in cui la somministrazione di una quantità efficace di rAAV mediante iniezione intravitreale o subretinale in un occhio di un soggetto primate o umano porta a una riduzione della neovascolarizzazione nell'occhio.

5 [0054] Vengono inoltre descritti qui virioni di virus adenoassociati ricombinanti (rAAV) per ridurre la neovascolarizzazione comprendenti: (a) una proteina variante del capsido di AAV, in cui la proteina variante del capsido di AAV  
10 comprende una modificazione amminoacidica in una regione esposta al solvente della proteina del capsido di AAV, e in cui la proteina variante del capsido conferisce una capacità aumentata nell'attraversare la membrana limitante interna (ILM) dell'occhio; e (b) un acido nucleico eterologo comprendente una  
15 sequenza nucleotidica codificante un prodotto genico, e in cui la somministrazione di una quantità efficace di rAAV mediante iniezione intravitreale o subretinale in un occhio di un soggetto primate o umano porta a una riduzione della neovascolarizzazione nell'occhio.

20 [0055] Vengono inoltre descritti qui virioni di virus adenoassociati ricombinanti (rAAV), comprendenti: (a) una proteina variante del capsido di AAV, in cui la proteina variante del capsido di AAV comprende un inserimento peptidico di LGETTRP dopo una posizione amminoacidica corrispondente al 587 di AAV2,  
25 e in cui la proteina variante del capsido conferisce una capacità

aumentata nel rilasciare un prodotto genico attraverso la membrana limitante interna (ILM) di un occhio nei primati; e (b) un acido nucleico eterologo comprendente una sequenza nucleotidica codificante il prodotto genico.

5 [0056] Vengono inoltre descritte qui composizioni di terapia genica in una forma di dosaggio unitario per trattare un disturbo o una malattia oculare, comprendenti: (a) un virione di un virus adenoassociato ricombinante (rAAV) comprendente: (i) una proteina variante del capsido di AAV, in cui la proteina variante  
10 del capsido di AAV comprende una modificazione amminoacidica in una regione esposta al solvente della proteina del capsido e mostra un'aumentata infettività delle cellule della retina rispetto a una corrispondente proteina del capsido di AAV non variante; e (ii) un acido nucleico eterologo comprendente una  
15 sequenza nucleotidica codificante un prodotto genico, in cui il prodotto genico quando trasdotto riduce la neovascolarizzazione nell'occhio di un soggetto primate o umano; e (b) un eccipiente farmaceuticamente accettabile; dove il virione rAAV è in una quantità sufficiente per ridurre almeno parzialmente la  
20 neovascolarizzazione quando viene somministrato mediante iniezione intravitreale o subretinale nell'occhio di un primate come dose unitaria.

[0057] Vengono inoltre descritti qui metodi per trattare un disturbo o una malattia oculare, comprendenti la somministrazione  
25 di una dose unitaria di una terapia genica rAAV descritta qui a



un soggetto, per esempio, un soggetto umano.

[0058] Il termine "agente anti-VEGF" comprende qualsiasi agente terapeutico, comprendente proteine, polipeptidi, peptidi, proteine di fusione, proteine multimeriche, prodotti genici, anticorpi, anticorpi monoclonali umani, frammenti anticorpali, aptameri, piccole molecole, inibitori delle chinasi, recettori o frammenti recettoriali, o molecole di acidi nucleici, che possono ridurre, interferire con, spezzare, bloccare e/o inibire l'attività o la funzione di un VEGF endogeno e/o di un recettore endogeno del VEGF (VEGFR), oppure l'interazione o la via metabolica di VEGF-VEGFR in vivo. Un agente anti-VEGF può essere uno qualsiasi degli agenti terapeutici noti che possono ridurre la nuova crescita di vasi sanguigni o la formazione e/o l'edema, o il rigonfiamento, quando rilasciati in una cellula, un tessuto, o un soggetto in vivo, per esempio, ranibizumab o bevacizumab. In alcuni casi, un agente anti-VEGF può essere presente in natura, non presente in natura, o sintetico. In alcuni casi, un agente anti-VEGF può essere derivato da una molecola presente in natura che è stata successivamente modificata o mutata per conferire un'attività anti-VEGF. In alcuni casi, un agente anti-VEGF è una proteina di fusione o chimerica. In tali proteine, i domini funzionali o i polipeptidi sono artificialmente fusi a un gruppo funzionale o un polipeptide per formare una proteina di fusione o chimerica che può sequestrare il VEGF in vivo oppure funzionare come falso bersaglio di VEGFR. In alcuni casi, un

agente anti-VEGF è una proteina di fusione o chimerica che blocca il VEGFR endogeno interagendo con i suoi ligandi.

[0059] Come utilizzato qui, "VEGF" può riferirsi a qualsiasi isoforma del VEGF, se non richiesto diversamente, comprendente, 5 ma senza limitazione, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, o qualsiasi combinazione, o qualsiasi frammento funzionale o variante di questi. Se non richiesto diversamente, "VEGF" può riferirsi a qualsiasi membro della famiglia VEGF, comprendente i membri: VEGF-A, fattore di crescita della placenta 10 (PGF), VEGF-B, VEGF-C, e VEGF-D, o qualsiasi combinazione, frammento funzionale, o variante di questi.

[0060] Come utilizzato qui, "recettore del VEGF" o "VEGFR" o "VEGF-R" può essere utilizzato per riferirsi a uno qualsiasi dei recettori del VEGF, comprendenti, ma senza limitazione, VEGFR-1 15 (o Flt-1), VEGFR-2 (o Flk-1/KDR), e VEGFR-3 (o Flt-4). Il VEGFR può essere una forma legata alla membrana o solubile, o un frammento funzionale o un troncamento di un recettore.

[0061] Esempi di agenti anti-VEGF includono, ma senza limitazione, ranibizumab, bevacizumab, o qualsiasi combinazione, 20 variante, o frammento funzionale di questi.

[0062] I titoli della sezione utilizzati qui sono solo per scopi organizzativi e non devono essere intesi come limitanti della materia in oggetto descritta.

### **Vettori**

25 [0063] Vari vettori virali possono essere utilizzati nella

terapia genica, comprendenti adenovirus, virus adenoassociati, retrovirus, e lentivirus.

**[0064]** In alcuni casi, le composizioni farmaceutiche e i metodi della descrizione prevedono il rilascio di una sequenza di acido nucleico (per esempio una sequenza di cDNA) codificante un agente anti-VEGF, un frammento funzionale o una sua variante, per le cellule della retina in un soggetto o in un paziente umano che lo richiede (per esempio un paziente con diagnosi di DMLE, RVO, DME). Il rilascio dell'acido nucleico di un transgene terapeutico a un paziente utilizzando un sistema di rilascio, quale un rAAV o un vettore virale, viene indicato anche come terapia genica.

**[0065]** In alcuni casi, il rilascio di una sequenza di acidi nucleici dell'agente anti-VEGF può essere eseguito utilizzando qualsiasi "vettore" adatto (indicato anche come "rilascio del gene" o "veicolo di trasferimento genico"). Vettore (per esempio rAAV), veicolo di rilascio, veicolo di rilascio del gene o veicolo di trasferimento genico, può comprendere qualsiasi macromolecola adatta o complesso di molecole comprendenti un polinucleotide da rilasciare a una cellula bersaglio, per esempio, a cellule della retina, comprendente un fotorecettore, una cellula gangliare retinica, una cellula di Müller, una cellula bipolare, una cellula amacrina, una cellula orizzontale, o una cellula dell'epitelio pigmentato retinico. In alcuni casi, una cellula bersaglio può essere qualsiasi cellula a cui viene rilasciata la molecola o il gene di un acido nucleico. Il

polinucleotide da rilasciare può comprendere una sequenza codificante di un transgene terapeutico, quale la sequenza che codifica ranibizumab.

**[0066]** La composizione e i metodi della descrizione forniscono  
5 qualsiasi metodo adatto per il rilascio di una sequenza di acidi nucleici anti-VEGF (per esempio ranibizumab) in un occhio o nelle cellule della retina di un primate diverso dall'uomo o di un soggetto umano. In alcuni casi, il rilascio della molecola di acido nucleico, del polinucleotide, o della terapia genica viene  
10 formulato o adattato per l'iniezione intravitreale in un occhio di un primate diverso dall'uomo o di un soggetto umano.

**[0067]** In alcuni casi, i vettori adatti includono, ma senza limitazione, vettori virali quali adenovirus, virus adenoassociati (AAV), e retrovirus, retrovirus, lentivirus,  
15 liposomi, complessi contenenti lipidi, nanoparticelle, e altri complessi macromolecolari in grado di rilasciare un polinucleotide alle cellule della retina. In alcuni casi, il vettore virale comprende un forte promotore eucariotico legato operabilmente al polinucleotide per esempio, un promotore di  
20 citomegalovirus (CMV) o un promotore costitutivo.

**[0068]** In alcuni casi, un vettore comprende un vettore virale ricombinante che incorpora una o più molecole di acidi nucleici. Come descritto qui, gli acidi nucleici si riferiscono ai polinucleotidi. Acido nucleico e polinucleotide possono essere  
25 utilizzati in modo intercambiabile. In alcuni casi, gli acidi

nucleici comprendono DNA o RNA. In alcuni casi, gli acidi nucleici includono DNA (per esempio cDNA) o RNA per l'espressione di un agente anti-VEGF o di un transgene terapeutico. In alcuni casi, l'RNA può includere un trascritto di un gene d'interesse  
5 (per esempio ranibizumab), introni, regioni non tradotte (UTRs), sequenze di terminazione e simili. In altri casi, il DNA può includere, ma senza limitazione, sequenze quali sequenze promotrici, un gene d'interesse (per esempio ranibizumab), UTR, sequenze di terminazione, e simili. In alcuni casi, può essere  
10 utilizzata una combinazione di DNA e RNA.

**[0069]** In alcuni casi, la presente descrizione fornisce un virus ricombinante, quali i virus adenoassociati ricombinanti (rAAV), come vettore per il rilascio e l'espressione di ranibizumab, bevacizumab, sFLT-1, o qualsiasi frammento funzionale o variante  
15 di questi, in un soggetto.

**[0070]** In alcuni casi, qualsiasi vettore virale adatto può essere geneticamente modificato o ottimizzato per l'uso con le composizioni e i metodi della descrizione. Per esempio, vettori virali ricombinanti derivati da adenovirus (Ad) o virus  
20 adenoassociati (AAV) possono essere alterati in modo tale che siano difettivi per la replicazione in soggetti umani o primati. In alcuni casi, sistemi ibridi di vettori virali possono essere ottenuti utilizzando procedimenti noti a un esperto nell'arte e utilizzati per rilasciare un acido nucleico codificante un agente  
25 anti-VEGF alle cellule della retina. In alcuni casi, un sistema

virale di rilascio o una terapia genica possono essere integrati in una sequenza nucleotidica comprendente un gene anti-VEGF nel genoma della cellula bersaglio (per esempio genoma di cellule della retina) e determinare un'espressione genica stabile del gene nel tempo. In alcuni casi, il gene anti-VEGF non è integrato nel genoma della cellula bersaglio, e viene espresso da un plasmide o un vettore introdotto nelle cellule bersaglio.

**[0071]** In alcuni casi, un vettore virale adatto per rilasciare una sequenza nucleotidica anti-VEGF alle cellule retiniche è un AAV o un rAAV, che sono piccoli virus non avvolti a DNA a singolo filamento. Gli rAAV sono parvovirus umani non patogeni e possono essere resi dipendenti da virus di supporto, comprendenti adenovirus, virus Herpes simplex, virus del vaiolo e CMV, per la replicazione. L'esposizione all'AAV selvatico (wt) non è associata o nota per causare alcuna patologia umana ed è comune nella popolazione complessiva, rendendo gli AAV o rAAV un sistema di rilascio adatto per la terapia genica. Gli AAV e rAAV utilizzati per la terapia genica per il rilascio di un transgene terapeutico, per esempio, ranibizumab, possono essere di qualsiasi sierotipo. In alcuni casi, le composizioni farmaceutiche e i metodi della descrizione prevedono l'uso di qualsiasi sierotipo adatto di AAV, comprendente AAV1, AAV2, AAV2,5, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, rh10, AAV-DJ, e qualsiasi AAV ibrido o chimerico di questi. In alcuni casi, il sierotipo utilizzato è basato sul

tropismo del virus, o sull'infettività di una cellula bersaglio d'interesse. In alcuni casi, l'AAV2 o l'rAAV2 viene utilizzato per rilasciare una sequenza nucleotidica codificante ranibizumab in un occhio o in cellule della retina di un soggetto mediante  
5 iniezione intravitreale o subretinica. In alcuni casi, rAAV2,7m8 viene utilizzato per rilasciare la sequenza di acidi nucleici di ranibizumab nelle cellule della retina di un soggetto.

**[0072]** In alcuni casi, virus AAV o rAAV, particelle, o virioni comprendenti una proteina variante del capsido avente  
10 un'aumentata infettività delle cellule bersaglio, per esempio cellule della retina, vengono utilizzati per incrementare la trasduzione delle cellule della retina o per incrementare il rilascio mirato del gene alle cellule della retina in un soggetto. In alcuni casi, il virione rAAV comprende una  
15 modificazione amminoacidica nell'ansa GH/ansa IV della proteina del capsido di AAV. In alcuni casi, il sito della modifica è una porzione accessibile al solvente dell'ansa GH/ansa IV della proteina del capsido di AAV. Diverse varianti del capsido di AAV sono note, compresa la variante di 7m8. In alcuni casi, un virione  
20 rAAV comprende una proteina variante del capsido di AAV che comprende un inserimento da 5 a 11 amminoacidi, per esempio, 7 sequenze di amminoacidi, nell'ansa GH di una proteina del capsido rispetto a una proteina del capsido di AAV progenitrice corrispondente, e in cui la proteina variante del capsido  
25 conferisce un'aumentata infettività delle cellule retiniche

rispetto all'infettività delle cellule retiniche mediante un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice o non modificata del capsido di AAV. In alcuni casi, un inserimento di una qualsiasi delle seguenti sequenze  
5 amminoacidiche può essere effettuato nell'ansa GH di una proteina del capsido: LGETTRP (7m8), NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTR, RAGGSVG, AVDTTKF, e STGKVPN. In alcuni casi, rAAV,7m8 comprendente ranibizumab viene utilizzato per la terapia genica.

**[0073]** In alcuni casi, una qualsiasi delle seguenti sequenze  
10 amminoacidiche: NETITRP, KAGQANN, KDPKTTN, KDTDTR, RAGGSVG, AVDTTKF, e STGKVPN può essere inserita nelle seguenti posizioni per generare una variante di rAAV per l'uso nella terapia genica:  
tra le posizioni 587 e 588 della proteina del capsido di AAV2;  
tra gli amminoacidi 590 e 591 della proteina del capsido di AAV1;  
15 tra gli amminoacidi 575 e 576 della proteina del capsido di AAV5;  
tra gli amminoacidi 590 e 591 della proteina del capsido di AAV6;  
tra gli amminoacidi 589 e 590 della proteina del capsido di AAV7;  
tra gli amminoacidi 590 e 591 della proteina del capsido di AAV8;  
tra gli amminoacidi 588 e 589 della proteina del capsido di AAV9;  
20 o tra gli amminoacidi 589 e 590 della proteina del capsido di AAV10.

**[0074]** In alcuni casi, l'acido nucleico codificante un prodotto genico quale il ranibizumab può essere sotto il controllo trascrizionale di un promotore che inizia la trascrizione del  
25 gene. In alcuni casi, il promotore è "forte" oppure è un promotore

costitutivo attivo, per esempio, il promotore del CMV. In alcuni casi, il promotore della connessina 36 viene utilizzato per guidare l'espressione di un transgene terapeutico, per esempio, ranibizumab. In alcuni casi, possono essere utilizzati promotori specifici per i tessuti per effettuare la trascrizione in tessuti o cellule specifici, quali cellule della retina, per ridurre l'eventuale tossicità o gli effetti indesiderati alle cellule non bersaglio. In alcuni casi, un virus e/o un plasmide ricombinanti utilizzati per generare un virus rAAV possono comprendere altri elementi trascrizionali o regolatori, quali sequenze poli A (poliadenilazione), regioni non tradotte (UTR), UTR in 3', o sequenze di terminazione. In alcuni casi, più geni possono essere espressi dal vettore o dal plasmide utilizzando il sito interno di entrata nel ribosoma (IRES) o elementi simili che permettono la coespressione di due o più proteine o che creano un multigene, o un mRNA policistronico.

**[0075]** In alcuni casi, l'rAAV e/o il plasmide utilizzati per generare virus rAAV comprendono gli elementi seguenti di acidi nucleici: una prima sequenza ITR; una sequenza del promotore; una sequenza intronica; una prima sequenza UTR; una sequenza codificante un transgene anti-VEGF; una seconda sequenza UTR; una sequenza di poliA; e una seconda sequenza ITR. In alcuni casi, viene utilizzata una sequenza di collegamento tra ciascuno di questi elementi di acidi nucleici. In alcuni casi, la sequenza codificante un transgene anti-VEGF comprende una sequenza

codificante la proteina transgenica di fusione anti-VEGF o un suo frammento funzionale.

[0076] In alcuni casi, il vettore virale della descrizione viene misurato come genomi vettoriali. In alcuni casi, una dose unitaria di virus ricombinante di questa descrizione comprende  
5 tra  $1 \times 10^{10}$  e  $2 \times 10^{10}$ , tra  $2 \times 10^{10}$  e  $3 \times 10^{10}$ , tra  $3 \times 10^{10}$  e  $4 \times 10^{10}$ , tra  $4 \times 10^{10}$  e  $5 \times 10^{10}$ , tra  $5 \times 10^{10}$  e  $6 \times 10^{10}$ , tra  $6 \times 10^{10}$  e  $7 \times 10^{10}$ , tra  $7 \times 10^{10}$  e  $8 \times 10^{10}$ , tra  $8 \times 10^{10}$  e  $9 \times 10^{10}$ , tra  $9 \times 10^{10}$  e  $10 \times 10^{10}$ , tra  $1 \times 10^{11}$  e  $2 \times 10^{11}$ , tra  $2 \times 10^{11}$  e  $3 \times 10^{11}$ , tra  $3 \times 10^{11}$  e  $4 \times 10^{11}$ , tra  $4 \times 10^{11}$  e  $5 \times 10^{11}$ ,  
10 tra  $5 \times 10^{11}$  e  $6 \times 10^{11}$ , tra  $6 \times 10^{11}$  e  $7 \times 10^{11}$ , tra  $7 \times 10^{11}$  e  $8 \times 10^{11}$ , tra  $8 \times 10^{11}$  e  $9 \times 10^{11}$ , tra  $9 \times 10^{11}$  e  $10 \times 10^{11}$ , tra  $1 \times 10^{12}$  e  $2 \times 10^{12}$ , tra  $2 \times 10^{12}$  e  $3 \times 10^{12}$ , tra  $3 \times 10^{12}$  e  $4 \times 10^{12}$ , tra  $4 \times 10^{12}$  e  $5 \times 10^{12}$ , tra  $5 \times 10^{12}$  e  $6 \times 10^{12}$ , tra  $6 \times 10^{12}$  e  $7 \times 10^{12}$ , tra  $7 \times 10^{12}$  e  $8 \times 10^{12}$ , tra  $8 \times 10^{12}$  e  $9 \times 10^{12}$ , tra  $9 \times 10^{12}$  e  $10 \times 10^{12}$ , tra  $1 \times 10^{13}$  e  $2 \times 10^{13}$ , tra  $2 \times 10^{13}$  e  $3 \times 10^{13}$ , tra  
15  $3 \times 10^{13}$  e  $4 \times 10^{13}$ , tra  $4 \times 10^{13}$  e  $5 \times 10^{13}$ , tra  $5 \times 10^{13}$  e  $6 \times 10^{13}$ , tra  $6 \times 10^{13}$  e  $7 \times 10^{13}$ , tra  $7 \times 10^{13}$  e  $8 \times 10^{13}$ , tra  $8 \times 10^{13}$  e  $9 \times 10^{13}$ , o tra  $9 \times 10^{13}$  e  $10 \times 10^{13}$  genomi vettoriali. In alcuni casi, l'rAAV di questa descrizione è circa  $2,1 \times 10^{12}$  genomi vettoriali. In alcuni casi, l'rAAV di questa descrizione è tra  $10^{10}$  e  $10^{13}$ , tra  $10^{10}$  e  $10^{11}$ ,  
20 tra  $10^{11}$  e  $10^{12}$ , tra  $10^{12}$  e  $10^{13}$ , tra  $10^{13}$  e  $10^{14}$ , tra  $2 \times 10^{11}$  e  $4 \times 10^{11}$ , tra  $3 \times 10^{11}$  e  $5 \times 10^{11}$ , tra  $4 \times 10^{11}$  e  $6 \times 10^{11}$ , tra  $5 \times 10^{11}$  e  $7 \times 10^{11}$ , tra  $6 \times 10^{11}$  e  $8 \times 10^{10}$ , tra  $7 \times 10^{11}$  e  $9 \times 10^{11}$ , tra  $8 \times 10^{11}$  e  $10 \times 10^{11}$ , tra  $1 \times 10^{12}$  e  $3 \times 10^{12}$ , tra  $2 \times 10^{12}$  e  $4 \times 10^{12}$ , tra  $3 \times 10^{12}$  e  $5 \times 10^{10}$  tra  $4 \times 10^{12}$  e  $6 \times 10^{12}$ , tra  $5 \times 10^{12}$  e  $7 \times 10^{12}$ , tra  $6 \times 10^{12}$  e  $8 \times 10^{12}$ , tra  $7 \times 10^{12}$  e  $9 \times 10^{12}$ , tra  
25  $8 \times 10^{12}$  e  $10 \times 10^{12}$ , tra  $1 \times 10^{13}$  e  $5 \times 10^{13}$ , tra  $5 \times 10^{13}$  e  $10 \times 10^{13}$ , tra  $10^{12}$

e  $5 \times 10^{12}$ , o tra  $5 \times 10^{12}$  e  $1 \times 10^{13}$  genomi vettoriali.

[0077] In alcuni casi, i virus ricombinanti di questa descrizione sono circa  $1E10$ , circa  $1,5E10$ , circa  $2E10$ , circa  $2,5E10$ , circa  $3E10$ , circa  $3,5E10$ , circa  $4E10$ , circa  $4,5E10$ , circa  $5E10$ , circa  
5  $5,5E10$ , circa  $6E10$ , circa  $6,5E10$ , circa  $7E10$ , circa  $7,5E10$ , circa  $8E10$ , circa  $8,5E10$ , circa  $9E10$ , circa  $9,5E10$ , circa  $10E10$ , circa  $1E11$ , circa  $1,5E11$ , circa  $2E11$ , circa  $2,5E11$ , circa  $3E11$ , circa  $3,5E11$ , circa  $4E11$ , circa  $4,5E11$ , circa  $5E11$ , circa  $5,5E11$ , circa  $6E11$ , circa  $6,5E11$ , circa  $7E11$ , circa  $7,5E11$ , circa  $8E11$ , circa  
10  $8,5E11$ , circa  $9E11$ , circa  $9,5E11$ , circa  $10E11$ , circa  $1E12$ , circa  $1,3E12$ , circa  $1,5E12$ , circa  $2E12$ , circa  $2,1E12$ , circa  $2,3E12$ , circa  $2,5E12$ , circa  $2,7E12$ , circa  $2,9E12$ , circa  $3E12$ , circa  $3,1E12$ , circa  $3,3E12$ , circa  $3,5E12$ , circa  $3,7E12$ , circa  $3,9E12$ , circa  $4E12$ , circa  $4,1E12$ , circa  $4,3E12$ , circa  $4,5E12$ , circa  
15  $4,7E12$ , circa  $4,9E12$ , circa  $5E12$ , circa  $5,1E12$ , circa  $5,3E12$ , circa  $5,5E12$ , circa  $5,7E12$ , circa  $5,9E12$ , circa  $6E12$ , circa  $6,1E12$ , circa  $6,3E12$ , circa  $6,5E12$ , circa  $6,7E12$ , circa  $6,9E12$ , circa  $7E12$ , circa  $7,1E12$ , circa  $7,3E12$ , circa  $7,5E12$ , circa  $7,7E12$ , circa  $7,9E12$ , circa  $8E12$ , circa  $8,1E12$ , circa  $8,3E12$ ,  
20 circa  $8,5E12$ , circa  $8,7E12$ , circa  $8,9E12$ , circa  $9E12$ , circa  $9,1E12$ , circa  $9,3E12$ , circa  $9,5E12$ , circa  $9,7E12$ , circa  $9,9E12$ , circa  $10E12$ , circa  $10,1E12$ , circa  $10,3E12$ , circa  $10,5E12$ , circa  $10,7E12$ , circa  $10,9E12$ , circa  $11E12$ , circa  $11,5E12$ , circa  $12E12$ , circa  $12,5E12$ , circa  $13E12$ , circa  $13,5E12$ , circa  $14E12$ , circa  
25  $14,5E12$ , circa  $15E12$ , circa  $15,5E12$ , circa  $16E12$ , circa  $16,5E12$ ,



circa 17E12, circa 17,5E12, circa 18E12, circa 18,5E12, circa 19E12, circa 19,5E12, circa 20E12, circa 20,5E12, circa 30E12, circa 30,5E12, circa 40E12, circa 40,5E12, circa 50E12, circa 50,5E12, circa 60E12, circa 60,5E12, circa 70E12, circa 70,5E12, 5 circa 80E12, circa 80,5E12, circa 90E12, circa 95E12, o circa 100E12, in cui E è un'abbreviazione per l'esponenziazione della base 10, e xEy si riferisce a x moltiplicato per la base 10 alla potenza/esponente y.

**[0078]** In alcuni casi, le composizioni farmaceutiche descritte  
10 qui comprendono virus ricombinanti di almeno 5E11, almeno 5,5E11, almeno 6E11, almeno 6,5E11, almeno 7E11, almeno 7,5E11, almeno 8E11, almeno 8,5E11, almeno 9E11, almeno 9,5E11, almeno 10E11, almeno 1E12, almeno 1,3E12, almeno 1,5E12, almeno 2E12, almeno 2,1E12, almeno 2,3E12, almeno 2,5E12, almeno 2,7E12, almeno  
15 2,9E12, almeno 3E12, almeno 3,1E12, almeno 3,3E12, almeno 3,5E12, almeno 3,7E12, almeno 3,9E12, almeno 4E12, almeno 4,1E12, almeno 4,3E12, almeno 4,5E12, almeno 4,7E12, almeno 4,9E12, almeno 5E12, almeno 5,1E12, almeno 5,3E12, almeno 5,5E12, almeno 5,7E12, almeno 5,9E12, almeno 6E12, almeno 6,1E12, almeno 6,3E12, almeno  
20 6,5E12, almeno 6,7E12, almeno 6,9E12, almeno 7E12, almeno 7,1E12, almeno 7,3E12, almeno 7,5E12, almeno 7,7E12, almeno 7,9E12, almeno 8E12, almeno 8,1E12, almeno 8,3E12, almeno 8,5E12, almeno 8,7E12, almeno 8,9E12, almeno 9E12, almeno 9,1E12, almeno 9,3E12, almeno 9,5E12, almeno 9,7E12, almeno 9,9E12, almeno 10E12, almeno  
25 10,1E12, almeno 10,3E12, almeno 10,5E12, almeno 10,7E12, almeno

*Allyo Montch*

10,9E12, almeno 11E12, almeno 11,5E12, almeno 12E12, almeno  
12,5E12, almeno 13E12, almeno 13,5E12, almeno 14E12, almeno  
14,5E12, almeno 15E12, almeno 15,5E12, almeno 16E12, almeno  
16,5E12, almeno 17E12, almeno 17,5E12, almeno 18E12, almeno  
5 18,5E12, almeno 19E12, almeno 19,5E12, almeno 20E12, almeno  
20,5E12, almeno 30E12, almeno 30,5E12, almeno 40E12, almeno  
40,5E12, almeno 50E12, almeno 50,5E12, almeno 60E12, almeno  
60,5E12, almeno 70E12, almeno 70,5E12, almeno 80E12, almeno  
80,5E12, almeno 90E12, almeno 95E12, o almeno 100E12 genomi  
10 vettoriali, in cui E è un'abbreviazione per l'esponenziazione  
della base 10, e in cui xEy si riferisce a x moltiplicato per la  
base 10 alla potenza/esponente y.

**[0079]** In alcuni casi, il vettore virale della descrizione viene  
misurato utilizzando la molteplicità di infezione (MOI). In  
15 alcuni casi, la MOI si riferisce al rapporto, o ai multipli del  
vettore o dei genomi virali delle cellule a cui l'acido nucleico  
può essere rilasciato. In alcuni casi, la MOI è  $1 \times 10^6$ . In alcuni  
casi, i virus ricombinanti della descrizione possono essere  
almeno  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  
20  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ ,  $1 \times 10^{15}$ ,  $1 \times 10^{16}$ ,  $1 \times 10^{17}$   
e  $1 \times 10^{18}$  MOI. In alcuni casi, i virus ricombinanti di questa  
descrizione possono essere da  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{15}$  MOI. In alcuni casi,  
i virus ricombinanti della descrizione possono essere al massimo  
 $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  
25  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ ,  $1 \times 10^{15}$ ,  $1 \times 10^{16}$ ,  $1 \times 10^{17}$ , e  $1 \times 10^{18}$

MOI.

**[0080]** In alcuni casi, l'acido nucleico può essere rilasciato senza l'uso di un virus (cioè con un vettore non virale), e può essere misurato come la quantità dell'acido nucleico.

5 Generalmente, qualsiasi quantità adatta di acido nucleico può essere utilizzata con le composizioni farmaceutiche e i metodi di questa descrizione. In alcuni casi, l'acido nucleico è almeno  
1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 pg, 10 pg, 100 pg, 200 pg, 300 pg, 400  
pg, 500 pg, 600 pg, 700 pg, 800 pg, 900 pg, 1 µg, 10 µg, 100 µg,  
10 200 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg,  
1 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng, 400 ng, 500 ng, 600 ng, 700  
ng, 800 ng, 900 ng, 1 mg, 10 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg,  
500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg 1 g, 2 g, 3 g, 4 g, o 5  
g. In alcuni casi, l'acido nucleico può essere al massimo circa  
15 1 pg, 10 pg, 100 pg, 1 pg, 10 pg, 100 pg, 200 pg, 300 pg, 400  
pg, 500 pg, 600 pg, 700 pg, 800 pg, 900 pg, 1 µg, 10 µg, 100 µg,  
200 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg,  
1 ng, 10 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng, 400 ng, 500 ng, 600 ng, 700  
ng, 800 ng, 900 ng, 1 mg, 10 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg,  
20 500 mg, 600 mg, 700 mg, 800 mg, 900 mg, 1 g, 2 g, 3 g, 4 g, o 5  
g.

**[0081]** In alcuni casi, può essere utilizzato un vettore autocomplementare (sc). L'uso di vettori autocomplementari di AAV può aggirare il requisito per la sintesi virale del secondo  
25 filamento di DNA e può condurre a una maggiore velocità di

espressione della proteina transgenica, come fornito da Wu, Hum Gene Ther. 2007, 18(2):171-82.

5 [0082] In alcuni aspetti, diversi vettori di AAV possono essere generati per permettere la selezione del sierotipo e del promotore maggiormente ottimale per l'uso con il transgene anti-VEGF.

10 [0083] In alcuni casi, il vettore può essere un vettore indirizzato a bersaglio, specialmente un rAAV a bersaglio (per esempio AAV2,7m8) che mostra un'infettività maggiore per una cellula specifica, quali le cellule della retina, o un fotorecettore, una cellula gangliare retinica, una cellula di Müller, una cellula bipolare, una cellula amacrina, una cellula orizzontale, o una cellula dell'epitelio pigmentato retinico. I vettori virali per l'uso nella descrizione possono includere  
15 quelli che mostrano una bassa tossicità e/o una bassa immunogenicità in un soggetto ed esprimere quantità terapeuticamente efficaci di un transgene anti-VEGF in un soggetto, per esempio, un paziente umano.

20 [0084] Vengono descritti qui composizioni farmaceutiche e metodi per rilasciare un acidonucleico codificante un agente anti-VEGF in una cellula della retina bersaglio di un soggetto utilizzando un rAAV comprendente una proteina variante del capsido di 7m8, o rAAV2,7m8, e una sequenza nucleotidica che codifica un transgene anti-VEGF in un primate diverso dall'uomo o in un soggetto umano.  
25 In alcuni esempi, il rilascio di un agente anti-VEGF tramite

terapia genica può essere utilizzato per migliorare o prevenire almeno parzialmente una malattia o una condizione dell'occhio descritta qui.

**[0085]** In alcuni casi, l'aumento dell'infettività delle cellule retiniche della variante rAAV (per esempio la variante 7m8) è almeno del 5%, almeno del 10%, almeno del 20%, almeno del 30%, almeno del 40%, almeno del 50%, almeno del 60%, almeno del 70%, almeno dell'80%, almeno del 90%, o almeno del 100% in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice o non modificata del capsido di AAV. In alcuni casi, l'aumento dell'infettività delle cellule della retina è un aumento tra il 5% e il 100%, tra il 5% e il 95%, tra il 5% e il 90%, tra il 5% e l'85%, tra il 5% e l'80%, tra il 5% e il 75%, tra il 5% e il 70%, tra il 5% e il 65%, tra il 5% e il 60%, tra il 5% e il 55%, tra il 5% e il 50%, tra il 5% e il 45%, tra il 5% e il 40%, tra il 5% e il 35%, tra il 5% e il 30%, tra il 5% e il 25%, tra il 5% e il 20%, tra il 5% e il 15%, tra il 5% e il 10% in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice o non modificata del capsido di AAV.

**[0086]** In alcuni casi, l'aumento nell'infettività delle cellule retiniche di una variante di rAAV è di almeno 1 volta, almeno 1,1 volte, almeno 1,2 volte, almeno 1,3 volte, almeno 1,4 volte, almeno 1,5 volte, almeno 1,6 volte, almeno 1,7 volte, almeno 1,8 volte, almeno 1,9 volte, o almeno 2 volte in confronto a un

virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice o non modificata del capsido di AAV. In alcuni casi, l'aumento dell'infettività è di almeno 2 volte, almeno 3 volte, almeno 4 volte, almeno 5 volte, almeno 6 volte, almeno 7 volte, 5 almeno di 8 volte, almeno 9 volte, o almeno 10 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV. In alcuni casi, l'aumento di infettività è di almeno 15 volte, almeno 20 volte, almeno 25 volte, almeno 30 volte, almeno 35 volte, almeno 40 volte, almeno 10 45 volte, almeno 50 volte, almeno 55 volte, almeno 60 volte, almeno 65 volte, almeno 70 volte, almeno 75 volte, almeno 80 volte, almeno 85 volte, almeno 90 volte, o almeno 100 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice o non modificata del capsido di AAV.

15 **[0087]** In alcuni casi, l'aumento dell'infettività delle cellule della retina è tra 10 volte e 100 volte, tra 10 volte e 95 volte, tra 10 volte e 90 volte, tra 10 volte e 85 volte, tra 10 volte e 80 volte, tra 10 volte e 75 volte, tra 10 volte e 70 volte, tra 10 volte e 65 volte, tra 10 volte e 60 volte, tra 10 volte e 55 20 volte, tra 10 volte e 50 volte, tra 10 volte e 45 volte, tra 10 volte e 40 volte, tra 10 volte e 35 volte, tra 10 volte e 30 volte, tra 10 volte e 25 volte, tra 10 volte e 20 volte, o tra 10 volte e 15 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice o non modificata del 25 capsido di AAV.

[0088] In alcuni casi, l'aumento dell'infettività delle cellule della retina è tra 2 volte e 20 volte, tra 2 volte e 19 volte, tra 2 volte e 18 volte, tra 2 volte e 17 volte, tra 2 volte e 16 volte, tra 2 volte e 15 volte, tra 2 volte e 14 volte, tra 2 volte e 13 volte, tra 2 volte e 12 volte, tra 2 volte e 11 volte, tra 2 volte e 10 volte, tra 2 volte e 9 volte, tra 2 volte e 8 volte, tra 2 volte e 7 volte, tra 2 volte e 6 volte, tra 2 volte e 5 volte, tra 2 volte e 4 volte, o tra 2 volte e 3 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice o non modificata del capsido di AAV.

[0089] In alcuni casi, una modificazione amminoacidica di una proteina del capsido descritta qui può conferire un aumento nella capacità di attraversare la membrana limitante interna (ILM) nell'occhio di un soggetto primate o umano in confronto alla capacità di un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice o non modificata del capsido di AAV di attraversare l'ILM di un occhio del soggetto. In alcuni casi, l'aumento nella capacità di attraversare l'ILM è un aumento almeno del 5%, almeno del 10%, almeno del 20%, almeno del 30%, almeno del 40%, almeno del 50%, almeno del 60%, almeno del 70%, almeno dell'80%, almeno del 90%, o almeno del 100% in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice o non modificata del capsido di AAV. In alcuni casi, l'aumento nella capacità di attraversare l'ILM è un aumento tra il 5% e il 100%, tra il 5% e il 95%, tra il 5% e il 90%, tra il

5% e l'85%, tra il 5% e l'80%, tra il 5% e il 75%, tra il 5% e il 70%, tra il 5% e il 65%, tra il 5% e il 60%, tra il 5% e il 55%, tra il 5% e il 50%, tra il 5% e il 45%, tra il 5% e il 40%, tra il 5% e il 35%, tra il 5% e il 30%, tra il 5% e il 25%, tra  
5 il 5% e il 20%, tra il 5% e il 15%, o tra il 5% e il 10% rispetto alla proteina progenitrice o non modificata del capsido di AAV.

**[0090]** In alcuni casi, l'aumento nella capacità di attraversare l'ILM è di almeno 1 volta, almeno 1,1 volte, almeno 1,2 volte, almeno 1,3 volte, almeno 1,4 volte, almeno 1,5 volte, almeno 1,6  
10 volte, almeno 1,7 volte, almeno 1,8 volte, almeno 1,9 volte, o almeno 2 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV. In alcuni casi, l'aumento nella capacità di attraversare l'ILM è di almeno 2 volte, almeno 3 volte, almeno 4 volte, almeno 5 volte,  
15 almeno 6 volte, almeno 7 volte, almeno di 8 volte, almeno 9 volte, o almeno 10 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV. In alcuni casi, l'aumento nella capacità di attraversare l'ILM è di almeno 15 volte, almeno 20 volte, almeno 25 volte,  
20 almeno 30 volte, almeno 35 volte, almeno 40 volte, almeno 45 volte, almeno 50 volte, almeno 55 volte, almeno 60 volte, almeno 65 volte, almeno 70 volte, almeno 75 volte, almeno 80 volte, almeno 85 volte, almeno 90 volte, o almeno 100 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina  
25 progenitrice o non modificata del capsido di AAV.

[0091] In alcuni casi, l'aumento nella capacità di attraversare l'ILM è tra 10 volte e 100 volte, tra 10 volte e 95 volte, tra 10 volte e 90 volte, tra 10 volte e 85 volte, tra 10 volte e 80 volte, tra 10 volte e 75 volte, tra 10 volte e 70 volte, tra 10 volte e 65 volte, tra 10 volte e 60 volte, tra 10 volte e 55 volte, tra 10 volte e 50 volte, tra 10 volte e 45 volte, tra 10 volte e 40 volte, tra 10 volte e 35 volte, tra 10 volte e 30 volte, tra 10 volte e 25 volte, tra 10 volte e 20 volte, o tra 10 volte e 15 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice o non modificata del capsido di AAV.

[0092] In alcuni casi, l'aumento nella capacità di attraversare l'ILM è tra 2 volte e 20 volte, tra 2 volte e 19 volte, tra 2 volte e 18 volte, tra 2 volte e 17 volte, tra 2 volte e 16 volte, tra 2 volte e 15 volte, tra 2 volte e 14 volte, tra 2 volte e 13 volte, tra 2 volte e 12 volte, tra 2 volte e 11 volte, tra 2 volte e 10 volte, tra 2 volte e 9 volte, tra 2 volte e 8 volte, tra 2 volte e 7 volte, tra 2 volte e 6 volte, tra 2 volte e 5 volte, tra 2 volte e 4 volte, o tra 2 volte e 3 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice o non modificata del capsido di AAV.

[0093] In alcuni casi, il vettore può essere un vettore retrovirale. I vettori retrovirali possono includere virus della leucemia murina di Moloney e virus basati sull'HIV. In alcuni casi può essere utilizzato un vettore virale basato sull'HIV, in

cui il vettore virale basato sull'HIV comprende almeno due vettori in cui i geni gag e pol sono da un genoma dell'HIV e il gene env è da un altro virus. In alcuni casi, possono essere utilizzati vettori virali a DNA. Questi vettori possono includere  
5 vettori pox quali vettori ortopox o avipox, vettori del virus dell'herpes quale il vettore del virus Herpes simplex I (HSV) [Geller, A. I. et al., J. Neurochem, 64: 487 (1995); Lim, F., et al., in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford Inghilterra) (1995); Geller, A. I. et al.,  
10 Proc Natl. Acad. Sci.: USA.: 90 7603 (1993); Geller, A. I., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 87:1149 (1990)], Adenovirus Vectors [LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., Nat. Genet. 3: 219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69: 2004 (1995)] e Adeno-associated Virus Vectors [Kaplitt, M. G.,  
15 et al., Nat. Genet. 8:148 (1994).

**[0094]** In alcuni casi, il vettore può essere un vettore lentivirale. I vettori lentivirali per l'uso nella descrizione possono derivare da un lentivirus umano e non umano (che comprende l'SIV). Esempi di vettori lentivirali possono includere  
20 sequenze nucleotidiche necessarie per la propagazione del vettore così come un promotore specifico per un tessuto legato operabilmente al gene di una proteina anti-VEGF. Le sequenze nucleotidiche possono includere LTR virali, un sito di legame dell'innesco, un tratto polipurinico, siti att, e un sito di  
25 incapsidazione.

[0095] In alcuni casi, il vettore può essere un vettore alfavirale. I vettori basati su alfavirus quali quelli fatti da virus della foresta Semliki (SFV) e virus Sindbis (SIN) possono anche essere utilizzati nella descrizione. L'uso di alfavirus viene descritto in Lundstrom, K., Intervirology 43:247-257, 2000 e Perri et al., Journal of Virology 74:9802-9807, 2000.

[0096] In alcuni casi, il vettore può essere un vettore pox virale. I vettori pox virali possono introdurre un gene nel citoplasma della cellula. I vettori virali avipox possono portare solo a un'espressione a breve termine del gene oppure dell'acido nucleico. I vettori adenovirali, i vettori di virus adenoassociati e i vettori dei virus Herpes simplex (HSV) possono essere utilizzati con le composizioni e i metodi della descrizione. Il vettore adenovirale può portare a un'espressione a termine più breve (per esempio inferiore a circa un mese) rispetto ai virus adenoassociati, in alcuni aspetti, e può esibire un'espressione molto più lunga. Il particolare vettore scelto può dipendere dalla cellula bersaglio e dalla condizione che viene trattata.

[0097] Vengono descritte qui composizioni e metodi per rilasciare un acido nucleico codificante un prodotto genico d'interesse in una cellula bersaglio di un soggetto. In alcuni esempi, il prodotto genico d'interesse viene rilasciato al soggetto dopo la somministrazione di un vettore comprendente il prodotto genico. In alcuni esempi, il rilascio del prodotto

genico può essere utilizzato per migliorare o per trattare almeno parzialmente una malattia o una condizione descritta qui. In alcuni esempi, la composizione può essere utilizzata come terapia genica oppure viene adattata per la terapia genica o per il  
5 rilascio di un anti-VEGF in vivo.

**[0098]** In alcuni esempi, vettore, veicolo di rilascio, veicolo di rilascio genico, o veicolo di trasferimento genico si riferiscono a qualsiasi macromolecola adatta o complesso di molecole comprendenti un polinucleotide da rilasciare a una  
10 cellula o un tessuto bersaglio o a un soggetto. In alcuni casi, una cellula bersaglio può essere qualsiasi cellula a cui l'acido nucleico o il gene viene rilasciato.

**[0099]** In alcuni casi, i vettori, per esempio, il DNA nudo o un plasmide, possono essere rilasciati in una cellula, un tessuto,  
15 o un soggetto utilizzando micelle; microemulsioni; liposomi; nanosfere; nanoparticelle; nanocapsule; nanoparticelle lipidiche solide; dendrimeri; derivati di polietilenimmina e nanotubi di carbonio a parete singola; e altri complessi macromolecolari in grado di mediare il rilascio di un polinucleotide a una cellula  
20 bersaglio. In alcuni casi, un vettore può essere una molecola organica o inorganica. In alcuni casi, un vettore è una piccola molecola (cioè <5 kD), o una macromolecola (cioè >5 kD).

**[0100]** In alcuni casi, un vettore comprende un vettore virale ricombinante (per esempio un vettore rAAV) che incorpora uno o  
25 più acidi nucleici. Come descritto qui, gli acidi nucleici

possono comprendere polinucleotidi. In alcuni esempi, gli acidi nucleici comprendono DNA o RNA. In alcuni casi, gli acidi nucleici includono DNA o RNA per l'espressione di un prodotto genico, o di un aptamero. In alcuni casi le molecole di RNA  
5 possono includere un trascritto di un gene d'interesse, introni, regioni non tradotte, sequenze di terminazione e simili. In altri casi, le molecole di DNA possono includere sequenze quali sequenze di geni promotori ibridi, sequenze promotrici costitutive forti, un gene d'interesse, regioni non tradotte,  
10 sequenze di terminazione e simili. In alcuni casi, qualsiasi combinazione di DNA e RNA può essere utilizzata.

**[0101]** In alcuni casi, la presente descrizione fornisce un virus ricombinante come vettore per mediare l'espressione di un prodotto genico, oppure una terapia genica per rilasciare un  
15 prodotto genico a cellule bersaglio oppure a un soggetto in vivo, per esempio, un occhio oppure il vitreo di un occhio. Qualsiasi vettore ricombinante virale adatto può essere geneticamente modificato a essere ottimizzato per l'uso con le composizioni e i metodi della descrizione. Per esempio, possono essere  
20 utilizzati i vettori virali ricombinanti derivati da adenovirus (Ad) o virus adenoassociati (AAV).

**[0102]** Si possono utilizzare vettori virali sia umani che non umani e il vettore virale ricombinante può essere alterato in modo tale che sia difettivo per la replicazione nell'uomo o in  
25 un soggetto. In alcuni casi, il vettore può essere un adenovirus

o un rAAV difettivo per la replicazione, comprendente un polinucleotide avente un promotore legato operabilmente a un transgene terapeutico che codifica un prodotto genico o un agente terapeutico, quale un agente anti-VEGF.

5 **[0103]** In alcuni casi, il vettore può essere un vettore retrovirale. I vettori retrovirali possono includere virus della leucemia murina di Moloney e virus basati sull'HIV. In alcuni casi può essere utilizzato un vettore virale basato sull'HIV, in cui il vettore virale basato sull'HIV comprende almeno due  
10 vettori in cui i geni gag e pol sono da un genoma dell'HIV e il gene env è da un altro virus. In alcuni casi, possono essere utilizzati vettori virali a DNA. Questi vettori possono includere vettori pox quali i vettori ortopox o avipox, vettori del virus dell'herpes quale un vettore del virus Herpes simplex I (HSV)  
15 [Geller, A. I. et al., J. Neurochem, 64: 487 (1995); Lim, F., et al., in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford Inghilterra) (1995); Geller, A. I. et al., Proc Natl. Acad. Sci.: USA.: 90 7603 (1993); Geller, A. I., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 87:1149 (1990)], Adenovirus  
20 Vectors [LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., Nat. Genet. 3: 219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69: 2004 (1995)] e Adeno-associated Virus Vectors [Kaplitt, M. G., et al., Nat. Genet. 8:148 (1994)].

**[0104]** In alcuni casi, il vettore può essere un vettore  
25 lentivirale. I vettori lentivirali per l'uso nella descrizione

possono derivare da un lentivirus umano e non umano (comprendente l'SIV). Gli esempi di vettori lentivirali possono includere sequenze nucleotidiche necessarie per la propagazione del vettore così come un promotore specifico per un tessuto legato operabilmente al gene di una proteina anti-VEGF. Le sequenze nucleotidiche possono includere LTR virali, un sito di legame dell'innesco, un tratto polipurinico, siti att, e un sito di incapsidazione.

[0105] In alcuni casi, vettori adenovirali, vettori di virus adenoassociati, e vettori dei virus Herpes simplex (HSV) possono essere utilizzati con le composizioni e i metodi della descrizione. Il particolare i vettori (per esempio lentivirus, adenovirus, o AAV) utilizzati possono dipendere dalla cellula bersaglio, dalla dimensione del transgene terapeutico o dall'agente da esprimere dal vettore, e/o dalla condizione che viene trattata.

[0106] In alcuni casi, il vettore è un vettore di un virus adenoassociato (AAV) o deriva da un AAV. Gli AAV sono piccoli virus non avvolti a DNA a singolo filamento. Sono parvovirus umani non patogeni e possono essere dipendenti da virus di supporto, comprendenti adenovirus, virus Herpes simplex, virus del vaiolo e CMV, per la replicazione. L'esposizione a un AAV selvatico non è associata o nota per causare alcuna patologia umana ed è comune nella popolazione complessiva, e solitamente colpisce nella prima decade di vita in associazione con

un'infezione adenovirale.

[0107] In alcuni esempi, l'rAAV può essere un AAV nativo o selvatico del sierotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o DJ. In alcuni esempi, l'rAAV può essere un AAV chimerico  
5 comprendente proteine del capsido da almeno due sierotipi. In alcuni casi, un virus o un virione rAAV può comprendere una proteina variante del capsido di AAV. In alcuni casi, la proteina variante del capsido di AAV può comprendere una modificazione  
10 amminoacidica scelta dal gruppo consistente di una sostituzione, un inserimento, una delezione, e qualsiasi loro combinazione; rispetto a una proteina del capsido di AAV progenitrice corrispondente.

[0108] In alcuni casi, il virione rAAV può comprendere una delezione di almeno 1, almeno 2, almeno 3, almeno 4, almeno 5,  
15 almeno 6, almeno 7, almeno 8, almeno 9, almeno 10, almeno 11, almeno 12, almeno 13, almeno 14, almeno 15, almeno 16, almeno 17, almeno 18, almeno 19, o almeno 20 amminoacidi in una proteina del capsido rispetto a una proteina del capsido di AAV progenitrice corrispondente. In alcuni casi, il virione rAAV può  
20 comprendere una delezione di almeno 20, almeno 25, almeno 30, almeno 35, almeno 40, almeno 45, almeno 50, almeno 55, almeno 60, almeno 65, almeno 70, almeno 75, almeno 80, almeno 85, almeno 90, almeno 95 o almeno 100 amminoacidi in una proteina del capsido. In alcuni casi, il virione rAAV può comprendere una  
25 delezione al massimo di circa 100 amminoacidi, al massimo di

circa 200, al massimo di circa 300, o al massimo di circa 400  
amminoacidi in una proteina del capsido. In alcuni casi, il  
virione rAAV può comprendere una delezione da circa 1 a circa  
100, da circa 1 a circa 90, da circa 1 a circa 80, da circa 1 a  
5 circa 70, da circa 1 a circa 60, da circa 1 a circa 50, da circa  
1 a circa 40, da circa 1 a circa 30, da circa 1 a circa 20, da  
circa 1 a circa 15, da circa 1 a circa 10, o da circa 1 a circa  
5 amminoacidi in una proteina del capsido. In alcuni casi, il  
virione rAAV può comprendere una delezione da circa 5 amminoacidi  
10 a circa 20 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 19  
amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 18 amminoacidi, da  
circa 5 amminoacidi a circa 17 amminoacidi, da circa 5  
amminoacidi a circa 16 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a  
circa 15 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 14  
15 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 13 amminoacidi, da  
circa 5 amminoacidi a circa 12 amminoacidi, da circa 5  
amminoacidi a circa 11 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a  
circa 10 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 9  
amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 8 amminoacidi, da  
20 circa 5 amminoacidi a circa 7 amminoacidi, o da circa 5  
amminoacidi a circa 6 amminoacidi in una proteina del capsido.

**[0109]** In alcuni casi, il virione rAAV può comprendere un  
inserimento di almeno 1, almeno 2, almeno 3, almeno 4, almeno 5,  
almeno 6, almeno 7, almeno 8, almeno 9, almeno 10, almeno 11,  
25 almeno 12, almeno 13, almeno 14, almeno 15, almeno 16, almeno

17, almeno 18, almeno 19, o almeno 20 amminoacidi in una proteina del capsid rispetto a una proteina del capsid di AAV progenitrice corrispondente. In alcuni casi, il virione rAAV può comprendere un inserimento di almeno 20, almeno 25, almeno 30, 5 almeno 35, almeno 40, almeno 45, almeno 50, almeno 55, almeno 60, almeno 65, almeno 70, almeno 75, almeno 80, almeno 85, almeno 90, almeno 95 o almeno 100 amminoacidi in una proteina del capsid. In alcuni casi, il virione rAAV può comprendere un inserimento al massimo di circa 100 amminoacidi, al massimo di 10 circa 200, al massimo di circa 300, o al massimo di circa 400 amminoacidi in una proteina del capsid. In alcuni casi, il virione rAAV può comprendere un inserimento da circa 1 a circa 100, da circa 1 a circa 90, da circa 1 a circa 80, da circa 1 a circa 70, da circa 1 a circa 60, da circa 1 a circa 50, da circa 15 1 a circa 40, da circa 1 a circa 30, da circa 1 a circa 20, da circa 1 a circa 15, da circa 1 a circa 10, o da circa 1 a circa 5 amminoacidi in una proteina del capsid. In alcuni casi, il virione rAAV può comprendere un inserimento da circa 5 amminoacidi a circa 20 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a 20 circa 19 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 18 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 17 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 16 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 15 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 14 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 13 25 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 12 amminoacidi, da

circa 5 amminoacidi a circa 11 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 10 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 9 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 8 amminoacidi, da circa 5 amminoacidi a circa 7 amminoacidi, o da  
5 circa 5 amminoacidi a circa 6 amminoacidi in una proteina del capsid.

**[0110]** In alcuni casi, il virione rAAV può comprendere una sostituzione di almeno 1, almeno 2, almeno 3, almeno 4, almeno 5, almeno 6, almeno 7, almeno 8, almeno 9, almeno 10, almeno 11,  
10 almeno 12, almeno 13, almeno 14, almeno 15, almeno 16, almeno 17, almeno 18, almeno 19, o almeno 20 amminoacidi in una proteina del capsid rispetto a una proteina del capsid di AAV progenitrice corrispondente. In alcuni casi, il virione rAAV può comprendere una sostituzione da circa 1 amminoacido a circa 20  
15 amminoacidi, da circa 1 amminoacido a circa 19 amminoacidi, da circa 1 amminoacido a circa 18 amminoacidi, da circa 1 amminoacido a circa 17 amminoacidi, da circa 1 amminoacido a circa 16 amminoacidi, da circa 1 amminoacido a circa 15 amminoacidi, da circa 1 amminoacido a circa 14 amminoacidi, da  
20 circa 1 amminoacido a circa 13 amminoacidi, da circa 1 amminoacido a circa 12 amminoacidi, da circa 1 amminoacido a circa 11 amminoacidi, da circa 1 amminoacido a circa 10 amminoacidi, da circa 1 amminoacido a circa 9 amminoacidi, da circa 1 amminoacido a circa 8 amminoacidi, da circa 1 amminoacido  
25 a circa 7 amminoacidi, da circa 1 amminoacido a circa 6

amminoacidi, da circa 1 a circa 5 amminoacidi, da circa 1 a circa 4 amminoacidi, da circa 1 a circa 3 amminoacidi, o da circa 1 a circa 2 amminoacidi in una proteina del capsido.

[0111] In alcuni casi, il virione rAAV può comprendere almeno  
5 circa 1, almeno circa 2, almeno circa 3, almeno circa 4, almeno  
circa 5, almeno circa 6, almeno circa 7, almeno circa 8, almeno  
circa 9, almeno circa 10, almeno circa 11, almeno circa 12,  
almeno circa 13, almeno circa 14, almeno circa 15, almeno circa  
16, almeno circa 17, almeno circa 18, almeno circa 19, o almeno  
10 circa 20 inserzioni, delezioni o sostituzioni amminoacidiche  
totali in una proteina del capsido rispetto a una proteina  
corrispondente progenitrice, non modificata del capsido. In  
alcuni casi, il virione rAAV può comprendere almeno circa 20,  
almeno circa 25, almeno circa 30, almeno circa 35, almeno circa  
15 40, almeno circa 45, almeno circa 50, almeno circa 55, almeno  
circa 60, almeno circa 65, almeno circa 70, almeno circa 75,  
almeno circa 80, almeno circa 85, almeno circa 90, almeno circa  
95, o almeno circa 100 inserzioni, delezioni o sostituzioni  
amminoacidiche totali in una proteina del capsido rispetto a una  
20 proteina corrispondente progenitrice, non modificata del  
capsido. In alcuni casi, il virione rAAV può comprendere almeno  
circa 100, almeno circa 200, almeno circa 300, o almeno circa  
400 inserzioni, delezioni o sostituzioni amminoacidiche totali  
in una proteina del capsido rispetto a una proteina  
25 corrispondente progenitrice, non modificata del capsido.

[0112] In alcuni casi, il virione rAAV comprende una proteina variante del capsido con una sequenza amminoacidica che è almeno circa il 50%, almeno circa il 55%, almeno circa il 60%, almeno circa il 65%, almeno circa il 70%, almeno circa l'80%, almeno  
5 circa l'85%, almeno circa l'86%, almeno circa l'87%, almeno circa l'88%, almeno circa l'89%, almeno circa il 90%, almeno circa il 91%, almeno circa il 92%, almeno circa il 93%, almeno circa il 94%, almeno circa il 95%, almeno circa il 96%, almeno circa il 97%, almeno circa il 98% o almeno circa il 99% omologa a una  
10 proteina del capsido di una proteina progenitrice, non modificata del capsido di AAV.

[0113] In alcuni casi, la modifica può essere dopo l'amminoacido 587 dell'AAV2, o dopo il residuo corrispondente di una subunità del capsido di un altro sierotipo dell'AAV. Si dovrebbe notare  
15 che il residuo 587 è basato su una proteina del capsido di AAV2. Una modifica può anche essere incorporata a un sito corrispondente in un sierotipo dell'AAV diverso da AAV2 (per esempio AAV8, AAV9, ecc.). Coloro che sono esperti nell'arte saprebbero, sulla base di un confronto delle sequenze  
20 amminoacidiche di proteine del capsido di vari sierotipi di AAV, dove sarebbe un sito di modificazione corrispondente all'amminoacido 587 dell'AAV2 in una proteina del capsido di qualsiasi dato sierotipo dell'AAV. Si veda, per esempio, Numero di accesso di GenBank NP-049542 per AAV1; Numero di accesso di  
25 GenBank AAD13756 per AAV5; Numero di accesso di GenBank AAB95459

per AAV6; Numero di accesso di GenBank YP-077178 per AAV7; Numero di accesso di GenBank YP-077180 per AAV8; Numero di accesso di GenBank AAS99264 per AAV9 e Numero di accesso di GenBank AAT46337 per AAV10.

5 [0114] In alcuni casi, la modifica amminoacidica è un inserimento da circa 5 amminoacidi a circa 11 amminoacidi in un'ansa GH o un'ansa IV di una proteina. In alcuni casi, la modifica amminoacidica è un inserimento che comprende uno o più amminoacidi che spezzano una regione esposta al solvente della  
10 proteina del capsido per includere un'ansa GH. In alcuni casi specifici, la modifica comprende l'inserimento della sequenza amminoacidica LGETTRP tra il residuo 587 e 588 nel VP1 dell'AAV2. In alcuni casi, altre inserzioni o varianti di AAV2 possono essere utilizzati come vettori o come terapia genica per  
15 rilasciare un agente anti-VEGF in un soggetto, per esempio, sFLT-1, ranibizumab, o bevacizumab.

[0115] In alcuni casi, una modificazione amminoacidica di una proteina del capsido descritta qui può conferire un aumento di infettività di una cellula oculare rispetto all'infettività della  
20 cellula retinica da un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice o non modificata del capsido di AAV. In alcuni casi, la cellula oculare può essere una cellula fotorecettore (per esempio bastoncelli; coni). In alcuni casi, la cellula oculare può essere una cellula gangliare retinica  
25 (RGC). In alcuni casi, la cellula retinica può essere una cellula

dell'epitelio pigmentato retinico (RPE). In alcuni casi, la cellula oculare può essere una cellula di Müller. In alcuni casi, la cellula oculare può essere un astrocita. In alcuni casi, le cellule della retina possono includere cellule amacrine, cellule  
5 bipolari, o cellule orizzontali.

[0116] In alcuni casi, l'aumento di infettività è un aumento di almeno circa il 5%, almeno circa il 10%, almeno circa il 20%, almeno circa il 30%, almeno circa il 40%, almeno circa il 50%, almeno circa il 60%, almeno circa il 70%, almeno circa l'80%,  
10 almeno circa il 90% o almeno circa il 100% in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV. In alcuni casi, l'aumento di infettività è un aumento tra circa il 5% e circa il 100%, tra circa il 5% e circa il 95%, tra circa il 5% e circa il 90%, tra  
15 circa il 5% e circa l'85%, tra circa il 5% e circa l'80%, tra circa il 5% e circa il 75%, tra circa il 5% e circa il 70%, tra circa il 5% e circa il 65%, tra circa il 5% e circa il 60%, tra circa il 5% e circa il 55%, tra circa il 5% e circa il 50%, tra circa il 5% e circa il 45%, tra circa il 5% e circa il 40%, tra  
20 circa il 5% e circa il 35%, tra circa il 5% e circa il 30%, tra circa il 5% e circa il 25%, tra circa il 5% e circa il 20%, tra circa il 5% e circa il 15%, o tra circa il 5% e circa il 10% in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV.

25 [0117] In alcuni casi, l'aumento di infettività è di almeno circa

1 volta, almeno circa 1,1 volte, almeno circa 1,2 volte, almeno  
circa 1,3 volte, almeno circa 1,4 volte, almeno circa 1,5 volte,  
almeno circa 1,6 volte, almeno circa 1,7 volte, almeno circa 1,8  
volte, almeno circa 1,9 volte, o almeno circa 2 volte in confronto  
5 a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina  
progenitrice del capsido di AAV. In alcuni casi, l'aumento di  
infettività è di almeno circa 2 volte, almeno circa 3 volte,  
almeno circa 4 volte, almeno circa 5 volte, almeno circa 6 volte,  
almeno circa 7 volte, almeno circa 8 volte, almeno circa 9 volte,  
10 o di almeno circa 10 volte in confronto a un virione di AAV  
comprendente la corrispondente proteina progenitrice del capsido  
di AAV. In alcuni casi, l'aumento di infettività è di almeno  
circa 15 volte, almeno circa 20 volte, almeno circa 25 volte,  
almeno circa 30 volte, almeno circa 35 volte, almeno circa 40  
15 volte, almeno circa 45 volte, almeno circa 50 volte, almeno circa  
55 volte, almeno circa 60 volte, almeno circa 65 volte, almeno  
circa 70 volte, almeno circa 75 volte, almeno circa 80 volte,  
almeno circa 85 volte, almeno circa 90 volte, o almeno di circa  
100 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la  
20 corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV.

**[0118]** In alcuni casi, l'aumento di infettività è tra circa 10  
volte e circa 100 volte, tra circa 10 volte e circa 95 volte,  
tra circa 10 volte e circa 90 volte, tra circa 10 volte e circa  
85 volte, tra circa 10 volte e circa 80 volte, tra circa 10 volte  
25 e circa 75 volte, tra circa 10 volte e circa 70 volte, tra circa

10 volte e circa 65 volte, tra circa 10 volte e circa 60 volte,  
tra circa 10 volte e circa 55 volte, tra circa 10 volte e circa  
50 volte, tra circa 10 volte e circa 45 volte, tra circa 10 volte  
e circa 40 volte, tra circa 10 volte e circa 35 volte, tra circa  
5 10 volte e circa 30 volte, tra circa 10 volte e circa 25 volte,  
tra circa 10 volte e circa 20 volte, o tra circa 10 volte e circa  
15 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la  
corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV.

**[0119]** In alcuni casi, l'aumento di infettività è tra circa 2  
10 volte e circa 20 volte, tra circa 2 volte e circa 19 volte, tra  
circa 2 volte e circa 18 volte, tra circa 2 volte e circa 17  
volte, tra circa 2 volte e circa 16 volte, tra circa 2 volte e  
circa 15 volte, tra circa 2 volte e circa 14 volte, tra circa 2  
volte e circa 13 volte, tra circa 2 volte e circa 12 volte, tra  
15 circa 2 volte e circa 11 volte, tra circa 2 volte e circa 10  
volte, tra circa 2 volte e circa 9 volte, tra circa 2 volte e  
circa 8 volte, tra circa 2 volte e circa 7 volte, tra circa 2  
volte e circa 6 volte, tra circa 2 volte e circa 5 volte, tra  
circa 2 volte e circa 4 volte, o tra circa 2 volte e circa 3  
20 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la  
corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV.

**[0120]** In alcuni casi, una modificazione amminoacidica di una  
proteina del capsido descritta qui può conferire un aumento nella  
capacità di attraversare la membrana limitante interna (ILM)  
25 nell'occhio di un soggetto in confronto alla capacità di un

virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice o non modificata del capsido di AAV di attraversare l'ILM dell'occhio del soggetto.

[0121] In alcuni casi, l'aumento nella capacità di attraversare l'ILM è un aumento di almeno circa il 5%, almeno circa il 10%, almeno circa il 20%, almeno circa il 30%, almeno circa il 40%, almeno circa il 50%, almeno circa il 60%, almeno circa il 70%, almeno circa l'80%, almeno circa il 90% o almeno circa il 100% in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV. In alcuni casi, l'aumento nella capacità di attraversare l'ILM è un aumento tra circa il 5% e circa il 100%, tra circa il 5% e circa il 95%, tra circa il 5% e circa il 90%, tra circa il 5% e circa l'85%, tra circa il 5% e circa l'80%, tra circa il 5% e circa il 75%, tra circa il 5% e circa il 70%, tra circa il 5% e circa il 65%, tra circa il 5% e circa il 60%, tra circa il 5% e circa il 55%, tra circa il 5% e circa il 50%, tra circa il 5% e circa il 45%, tra circa il 5% e circa il 40%, tra circa il 5% e circa il 35%, tra circa il 5% e circa il 30%, tra circa il 5% e circa il 25%, tra circa il 5% e circa il 20%, tra circa il 5% e circa il 15%, o tra circa il 5% e circa il 10% in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV.

[0122] In alcuni casi, l'aumento nella capacità di attraversare l'ILM è di almeno circa 1 volta, almeno circa 1,1 volte, almeno

circa 1,2 volte, almeno circa 1,3 volte, almeno circa 1,4 volte,  
almeno circa 1,5 volte, almeno circa 1,6 volte, almeno circa 1,7  
volte, almeno circa 1,8 volte, almeno circa 1,9 volte, o di  
almeno circa 2 volte in confronto a un virione di AAV comprendente  
5 la corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV. In  
alcuni casi, l'aumento nella capacità di attraversare l'ILM è di  
almeno circa 2 volte, almeno circa 3 volte, almeno circa 4 volte,  
almeno circa 5 volte, almeno circa 6 volte, almeno circa 7 volte,  
almeno circa di 8 volte, almeno circa 9 volte, o di almeno circa  
10 10 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la  
corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV. In  
alcuni casi, l'aumento nella capacità di attraversare l'ILM è di  
almeno circa 15 volte, almeno circa 20 volte, almeno circa 25  
volte, almeno circa 30 volte, almeno circa 35 volte, almeno circa  
15 40 volte, almeno circa 45 volte, almeno circa 50 volte, almeno  
circa 55 volte, almeno circa 60 volte, almeno circa 65 volte,  
almeno circa 70 volte, almeno circa 75 volte, almeno circa 80  
volte, almeno circa 85 volte, almeno circa 90 volte, o di almeno  
circa 100 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la  
20 corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV.

**[0123]** In alcuni casi, l'aumento nella capacità di attraversare  
l'ILM è tra circa 10 volte e circa 100 volte, tra circa 10 volte  
e circa 95 volte, tra circa 10 volte e circa 90 volte, tra circa  
10 volte e circa 85 volte, tra circa 10 volte e circa 80 volte,  
25 tra circa 10 volte e circa 75 volte, tra circa 10 volte e circa

70 volte, tra circa 10 volte e circa 65 volte, tra circa 10 volte e circa 60 volte, tra circa 10 volte e circa 55 volte, tra circa 10 volte e circa 50 volte, tra circa 10 volte e circa 45 volte, tra circa 10 volte e circa 40 volte, tra circa 10 volte e circa 35 volte, tra circa 10 volte e circa 30 volte, tra circa 10 volte e circa 25 volte, tra circa 10 volte e circa 20 volte, o tra circa 10 volte e circa 15 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV.

10 [0124] In alcuni casi, l'aumento nella capacità di attraversare l'ILM è tra circa 2 volte e circa 20 volte, tra circa 2 volte e circa 19 volte, tra circa 2 volte e circa 18 volte, tra circa 2 volte e circa 17 volte, tra circa 2 volte e circa 16 volte, tra circa 2 volte e circa 15 volte, tra circa 2 volte e circa 14 volte, tra circa 2 volte e circa 13 volte, tra circa 2 volte e circa 12 volte, tra circa 2 volte e circa 11 volte, tra circa 2 volte e circa 10 volte, tra circa 2 volte e circa 9 volte, tra circa 2 volte e circa 8 volte, tra circa 2 volte e circa 7 volte, tra circa 2 volte e circa 6 volte, tra circa 2 volte e circa 5 volte, tra circa 2 volte e circa 4 volte, o tra circa 2 volte e circa 3 volte in confronto a un virione di AAV comprendente la corrispondente proteina progenitrice del capsido di AAV.

[0125] Un vantaggio della terapia genica è che richiede una somministrazione meno frequente di un agente terapeutico quale l'agente anti-VEGF come descritto qui, e fornisce un rilascio

prolungato o continuato dell'agente terapeutico in confronto a  
metodi convenzionali di somministrazione proteica. La terapia  
genica che utilizza vettori, per esempio, AAV2,7m8, che sono  
indirizzati a un tessuto specifico o un tipo cellulare  
5 d'interesse può minimizzare anche gli effetti fuori bersaglio, o  
fornire un rilascio più indirizzato a bersaglio di un agente  
terapeutico quale l'agente anti-VEGF. Con un rilascio prolungato  
o sostenuto di un agente anti-VEGF in vivo tramite terapia  
genica, uno sarebbe in grado di somministrare la composizione  
10 farmaceutica non più di una volta in almeno 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,  
9, 10 o più anni.

#### ***Agenti terapeutici***

[0126] In alcuni casi, una terapia genica viene utilizzata per  
rilasciare un transgene terapeutico avente un'attività anti-VEGF  
15 che è adatto o adattato per una somministrazione a un occhio o  
al vitreo di un occhio di un primate diverso dall'uomo o di un  
soggetto umano. In alcuni casi, l'rAAV comprendente un capsido  
variante (per esempio AAV2,7m8) descritto qui comprende una  
sequenza di acido nucleico eterologa che codifica un agente anti-  
20 VEGF utilizzato per rilasciare la sequenza del gene anti-VEGF in  
cellule della retina a seguito di un'iniezione intravitreale o  
subretinale a un soggetto. In alcuni casi, l'rAAV comprendente  
il gene anti-VEGF viene formulato per la terapia genica e  
l'iniezione intravitreale. In alcuni casi, il gene anti-VEGF si  
25 riferisce a un frammento funzionale o una sua variante. In alcuni

casi, la sequenza di acidi nucleici di agenti anti-VEGF, quali sFLT-1, ranibizumab, o bevacizumab, deriva dalla loro sequenza amminoacidica, che è facilmente disponibile. In alcuni casi, la sequenza di acidi nucleici di agenti anti-VEGF, quali sFLT-1, 5 ranibizumab, o bevacizumab, viene ulteriormente ottimizzata per i codoni per migliorare la sua espressione in un soggetto. In alcuni casi, la sequenza di acidi nucleici e/o la sequenza amminoacidica di un agente anti-VEGF viene modificata per aumentare la sua attività, espressione, stabilità, e/o solubilità 10 in vivo.

**[0127]** L'ottimizzazione dei codoni può essere ottenuta con qualsiasi metodo noto nell'arte. L'ottimizzazione dei codoni si riferisce a un metodo per modificare una sequenza nucleotidica per l'espressione aumentata di un gene in cellule bersaglio o 15 cellule ospiti d'interesse, per esempio, cellule retiniche umane, sostituendo almeno un codone (per esempio circa o più di 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100 o più codoni) di una sequenza nativa con codoni che vengono utilizzati più frequentemente o che vengono utilizzati più frequentemente nella cellula ospite 20 mentre si mantiene la sequenza amminoacidica nativa. Le tabelle d'uso dei codoni sono facilmente disponibili, comprendenti per esempio, GenScript Codon Usage Frequency Table Tool a <http://www.genscript.com/tools/codon-frequency-table/>; Codon Usage Database a <http://www.kazusa.or.jp/codon/>; e Nakamura, Y., 25 et al. "Codon usage tabulated from the international DNA sequence

databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28:292 (2000).

[0128] In alcuni casi, la sequenza amminoacidica di un agente anti-VEGF codificato in una terapia genica è omologa almeno al  
5 75%, all'80%, all'85%, al 90%, al 91%, al 92%, al 93%, al 94%,  
al 95%, al 96%, al 97%, al 98%, al 99%, 99,9%, 99,99% o al 100%  
alla sequenza amminoacidica di uno qualsiasi dei seguenti agenti  
anti-VEGF: sFLT-1, ranibizumab, o bevacizumab. In alcuni casi,  
la sequenza di acidi nucleici utilizzata in una terapia genica o  
10 in un rAAV descritta qui viene confrontata alla sequenza  
corrispondente di cDNA della sequenza amminoacidica di uno  
qualsiasi tra sFLT-1, ranibizumab, o bevacizumab, e mostra almeno  
il 75%, l'80%, l'85%, il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il  
95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99%, il 99,9%, il 99,99% o il  
15 100% di omologia di sequenza tra le sequenze nucleotidiche di  
uno qualsiasi tra sFLT-1, ranibizumab, o bevacizumab. In alcuni  
casi, un anti-VEGF espresso dalla terapia genica è almeno l'80%,  
l'85%, il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il 95%, il 96%,  
il 97%, il 98%, il 99%, il 99,9%, il 99,99% o il 100% spazialmente  
20 omologo a uno qualsiasi tra sFLT-1, ranibizumab, o bevacizumab  
(per esempio in termini della sua struttura o conformazione  
secondaria, terziaria, e quaternaria). In alcuni casi, un agente  
anti-VEGF delle composizioni farmaceutiche e dei metodi qui  
descritti è al massimo l'80%, l'85%, il 90%, il 91%, il 92%, il  
25 93%, il 94%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99%, il 99,9%,

il 99,99% o il 100% spazialmente omologo a uno qualsiasi tra sFLT-1, ranibizumab, o bevacizumab utilizzati nello standard di cura (per esempio nella struttura o conformazione secondaria, terziaria, e quaternaria).

5 [0129] In alcuni esempi, un agente anti-VEGF come incluso in una terapia genica basata su rAAV comprende un capsid variante come descritto qui (per esempio la variante 7m8), codifica una proteina, una proteina di fusione, o un polipeptide che hanno almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'81%, almeno l'82%, almeno  
10 l'83%, almeno l'84%, almeno l'85%, almeno l'86%, almeno l'87%, almeno l'88%, almeno l'89%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il 95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98%, almeno il 99%, o almeno il 100% di omologia con le sequenze corrispondenti di cDNA  
15 dell'agente anti-VEGF (per esempio sFLT-1, ranibizumab, o bevacizumab). In alcuni casi, i metodi e le composizioni farmaceutiche descritti qui comprendono sFLT-1, ranibizumab, o bevacizumab, o un frammento funzionale o variante o mutante di questi. In alcuni casi, la sequenza di acidi nucleici di uno  
20 qualsiasi tra sFLT-1, ranibizumab, o bevacizumab viene modificata o ottimizzata per i codoni per aumentare la sua attività, espressione, e/o solubilità in vivo.

[0130] In alcuni casi, AAV2,7m8 viene utilizzato come terapia genica o come sistema di rilascio per uno qualsiasi tra sFLT-1,  
25 ranibizumab, o bevacizumab. AAV2,7m8-sVEGFR-1 si riferisce

all'rAAV2 comprendente l'inserimento 7m8 tra le posizioni 587 e 588 della proteina del capsido VP1 dell'AAV2 e a una sequenza nucleotidica codificante sVEGFR-1. AAV2,7m8-ranibizumab si riferisce all'rAAV2 comprendente l'inserimento 7m8 tra le  
5 posizioni 587 e 588 della proteina del capsido VP1 dell'AAV2 e a una sequenza nucleotidica codificante ranibizumab.

**[0131]** La presente descrizione contempla i metodi e le composizioni farmaceutiche come descritti qui comprendenti uno o più agenti terapeutici. In alcuni casi, l'agente terapeutico è  
10 un agente anti-VEGF. In alcuni casi, l'agente anti-VEGF viene espresso da un vettore rAAV o da una terapia genica, oppure viene rilasciato in una cellula o un tessuto bersaglio o in un soggetto in vivo. La terapia genica ha il vantaggio di fornire l'agente terapeutico, per esempio, un agente anti-VEGF, per un periodo di  
15 tempo prolungato in vivo, il che diminuisce la necessità di iniezioni ripetute in confronto alla somministrazione di una terapia a base di proteine. Tale vantaggio della terapia genica può condurre a un rilascio più prolungato dell'agente terapeutico in vivo, che fornisce un miglioramento rispetto alla terapia  
20 standard attuale. Inoltre, una terapia genica può fornire anche un rilascio più indirizzato a bersaglio dell'agente terapeutico in vivo, per esempio, alle cellule bersaglio, e può minimizzare gli effetti fuori bersaglio.

**[0132]** In alcuni casi, un prodotto genico descritto qui può  
25 essere un polipeptide che quando espresso può portare a una

riduzione della neovascolarizzazione in un occhio di un soggetto. In alcuni casi, il polipeptide espresso può essere un fattore, una proteina o un peptide antivascolare endoteliale di crescita (VEGF), o un inibitore dell'angiogenesi.

5 [0133] In alcuni casi, un prodotto genico descritto qui può essere un anticorpo anti-VEGF o un suo frammento che può veicolare o almeno parzialmente inibire il VEGF. In alcuni esempi, l'anticorpo può essere un anticorpo a lunghezza intera, comprendente sia una regione variabile che una regione Fc. In  
10 alcuni esempi, l'anticorpo può essere un frammento fv a catena singola. In alcuni esempi, l'anticorpo può avere un'affinità di legame definita a un epitopo di VEGF. In alcuni esempi, l'anticorpo può avere una Kd di almeno circa 1 mM, almeno circa 100  $\mu$ M, almeno circa 10  $\mu$ M, almeno circa 1  $\mu$ M, almeno circa 100  
15 nM, almeno circa 10 nM, almeno circa 1 nM, almeno circa 100 pM, almeno circa 10 pM, o di almeno circa 1 pM. In alcuni esempi, un agente anti-VEGF si lega a un VEGF o un VEGFR endogeno più forte rispetto al corrispondente VEGFR o VEGF endogeno. Un legame più forte dell'agente anti-VEGF permette all'agente anti-VEGF di  
20 sequestrare il VEGF endogeno o di bloccare proteine endogene dall'interazione con un VEGFR endogeno.

[0134] In alcuni casi, l'anticorpo anti-VEGF può essere un anticorpo monoclonale umanizzato. In alcuni esempi, l'anticorpo monoclonale umanizzato può essere il rhuMab. In alcuni casi,  
25 l'anticorpo anti-VEGF può essere il ranibizumab, un frammento

dell'anticorpo monoclonale, o una sua variante o un suo frammento. In alcuni casi, l'anticorpo anti-VEGF può essere il bevacizumab, un anticorpo monoclonale ricombinante umanizzato, o una sua variante o un suo frammento. In alcuni casi, l'agente anti-VEGF è il PAN-90806, o una sua variante o un suo frammento. In alcuni casi, l'agente terapeutico è una sequenza nucleotidica che codifica uno o più polipeptidi comprendenti un agente anti-VEGF come descritto qui, per esempio, un anticorpo, un frammento anticorpale, un anticorpo monoclonale, un anticorpo monoclonale umanizzato, una proteina di fusione, un aptamero, ecc. In alcuni casi, l'agente anti-VEGF è un recettore solubile che funge da falso bersaglio e che si lega a VEGF, o una forma solubile di uno più recettori del VEGF che possono sequestrare il VEGF in vivo.

15 [0135] In alcuni casi, un agente terapeutico descritto qui può essere un acido nucleico quale un aptamero, un RNA interferente, un mRNA e simili. In alcuni casi, l'aptamero può essere il pegaptanib. In alcuni casi, l'agente terapeutico può essere uno steroide o una piccola molecola. In alcuni esempi, lo steroide può essere un corticosteroide. Esempi di corticosteroidi possono includere triamcinolone, desametasone, fluocinolone acetone, cortisone, prednisolone, fluorometolone, e loro derivati. In alcuni esempi, lo steroide può essere uno steroide antinfiammatorio.

25 [0136] Il virus ricombinante, la terapia genica, le composizioni

farmaceutiche, e i metodi della presente descrizione possono comprendere una sequenza codificante una proteina anti-VEGF, comprendente, ma senza limitazione, proteine leganti il VEGF o loro frammenti funzionali come descritti nei brevetti US 5 5,712,380, 5,861,484 e 7,071,159, e anche come descritto nella pubblicazione US 2014/0371438. In alcuni casi, una proteina anti-VEGF comprende la proteina sFLT-1, ranibizumab, o bevacizumab come descritto qui.

**[0137]** In alcuni casi, la terapia genica, le composizioni farmaceutiche, e i metodi della presente descrizione possono comprendere una sequenza codificante una proteina anti-VEGF, per esempio, l'sFlt-1. In alcuni casi, un agente anti-VEGF include, ma senza limitazione, frammenti funzionali di sFlt-1, comprendenti sequenze o una sequenza del dominio 2 di sFlt-1. Un agente anti-VEGF può includere sequenze o polipeptidi espressi da sequenze di DNA codificanti simili utilizzando il codice genetico, una tecnica standard che viene intesa da parte di coloro che sono esperti nell'arte.

**[0138]** Come utilizzato qui, "proteina sFlt-1" o "sFlt" o "sVEGFR-1" vengono utilizzati in modo intercambiabile per riferirsi a una sequenza polipeptidica, o un suo frammento o una sua variante funzionale, con almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'81%, almeno l'82%, almeno l'83%, almeno l'84%, almeno l'85%, almeno l'86%, almeno l'87%, almeno l'88%, almeno l'89%, almeno il 90%, almeno il 91%, almeno il 92%, almeno il 93%, almeno il 94%, almeno il

95%, almeno il 96%, almeno il 97%, almeno il 98%, almeno il 99%,  
o almeno il 100% di omologia alla sequenza umana di sFLT-1, in  
modo tale che la proteina o il polipeptide di sFlt-1 si legghi al  
VEGF e/o al recettore del VEGF in vivo. La **Figura 2** illustra una  
5 sequenza nucleotidica di sFlt-1. L'omologia si riferisce alla %  
di conservazione dei residui in un allineamento tra le due  
sequenze (per esempio la proteina umana sFLT-1 naturale può  
includere qualsiasi variante adatta di sFLT-1, comprendente, ma  
senza limitazione, frammenti funzionali, sequenze comprendenti  
10 inserzioni, delezioni, sostituzioni, pseudoframmenti,  
pseudogeni, varianti di splicing o sequenze artificialmente  
ottimizzate. In alcuni casi, la "proteina sFLT-1" è almeno circa  
il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il 95%, il 96%, il 97%,  
il 98%, il 99%, o il 100% omologa alla sequenza proteica umana  
15 sFLT-1 presente in natura. In alcuni casi, la "proteina sFLT-1"  
è al massimo circa il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il  
95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99%, o il 100% omologa alla  
sequenza proteica umana sFLT-1 presente in natura. In alcuni  
casi, la "proteina sFLT-1" è almeno circa il 90%, il 91%, il 92%,  
20 il 93%, il 94%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99%, o il 100%  
spazialmente omologa alla conformazione proteica sFLT-1 umana  
presente in natura. In alcuni casi, la "proteina sFLT-1" è al  
massimo circa il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il 95%, il  
96%, il 97%, il 98%, il 99%, o il 100% spazialmente omologa alla  
25 conformazione proteica sFLT-1 umana presente in natura.

[0139] In alcuni casi, la forma troncata solubile del recettore del VEGF FLT-1, l'sFLT-1, è l'unico inibitore endogeno noto del VEGF. L'sFLT-1 può essere generato mediante splicing alternativo dell'RNA e gli manca il dominio prossimale alla membrana di tipo immunoglobulinico, la regione con l'estensione transmembrana e il dominio intracellulare tirosin-chinasico.

[0140] In alcuni casi, la somministrazione di una terapia genica o di una composizione farmaceutica come descritta qui, comprendente l'sFLT-1, può inibire o ridurre il VEGF o la sua attività in vivo legando o sequestrando il VEGF endogeno, o formando eterodimeri inattivi con le isoforme di membrana dei recettori di VEGF, FLTt-1 e FLK-1/KDR. Queste proprietà di sFLT-1 sono state descritte in Kendall e Thomas, 1993; Proc Natl Acad. Sci. 90: 10705-10709. In alcuni casi, frammenti funzionali di sFLT-1 possono essere utilizzati al posto della proteina a lunghezza intera. In alcuni casi, il dominio di legame di VEGF (dominio 2), o in alternativa il KDR, o un altro elemento della famiglia, può essere utilizzato per legare e inattivare VEGF.

[0141] In alcuni casi, i metodi e le composizioni farmaceutiche della presente descrizione comprendono un agente anti-VEGF che è bevacizumab o ranibizumab, un frammento funzionale o una variante di questi. Catt Research, Group; Martin; Martin, DF; Maguire, MG; Ying, GS; Grunwald, JE; Fine, SL; Jaffe, GJ (2011). "Ranibizumab and Bevacizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration". New England Journal of Medicine. 364 (20): 1897-



1908.

**[0142]** Le sequenze amminoacidiche della catena leggera e della catena pesante di ranibizumab sono disponibili pubblicamente alla banca dati di DrugBank, numero di accesso DB01270:

5 >Catena leggera di ranibizumab  
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSR  
FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD  
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL  
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>Catena pesante di ranibizumab  
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGE  
PTYAADFARRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWG  
QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHL

10 **[0143]** Le sequenze amminoacidiche della catena leggera e della catena pesante di bevacizumab sono disponibili pubblicamente alla banca dati di DrugBank, numero di accesso DB00112 (BTD00087, BIOD00087):

>Catena leggera di bevacizumab  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPSR  
FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD  
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL  
15 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

>Catena pesante di bevacizumab



EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGE  
PTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYYGSSHWYFDVWG  
QGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH  
TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP  
CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA  
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**[0144]** Il bevacizumab è un anticorpo ricombinante umanizzato IgG1 monoclonale che si lega a tutte le isoforme del VEGF-A e blocca l'angiogenesi inibendo il VEGF-A. Los, M.; Roodhart, J. M. L.; Voest, E. E. (2007). "Target Practice: Lessons from Phase III Trials with Bevacizumab and Vatalanib in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer". The Oncologist. 12 (4): 443-50; Shih, T; Lindley, C (novembre 2006). "Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies." Clinical therapeutics. 28 (11): 1779-802.

**[0145]** Il ranibizumab è un frammento di un anticorpo monoclonale umanizzato IgG1 ricombinante di isotipo kappa e si lega a tutte le isoforme del VEGF-A con un'affinità superiore a bevacizumab. A ranibizumab manca una regione Fc. In alcuni casi, un agente anti-VEGF è il bevacizumab o il ranibizumab, o un frammento o una variante funzionale di questi. In alcuni casi, un agente anti-VEGF è almeno circa l'80%, l'85%, il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99%, il 99,9%, il 99,99% o il 100% omologo alla sequenza di amminoacidi e/o di acidi nucleici (per esempio cDNA) di bevacizumab o ranibizumab.

*Poligo Montebello*

In alcuni casi, un agente anti-VEGF è al massimo circa il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99%, il 99,9%, il 99,99% o il 100% omologo alle sequenze di amminoacidi e/o di acidi nucleici (per esempio cDNA) di bevacizumab o ranibizumab note nel campo. In alcuni casi, un agente anti-VEGF è almeno circa il 90%, il 91%, il 92%, il 93%, il 94%, il 95%, il 96%, il 97%, il 98%, il 99%, il 99,9%, il 99,99% o il 100% spazialmente omologo alla conformazione proteica di bevacizumab o ranibizumab, comprendente le strutture secondarie, terziarie, o quaternarie.

[0146] Data una sequenza amminoacidica, si può facilmente generare il cDNA o la sequenza di acidi nucleici corrispondente da utilizzare in una terapia genica descritta qui. I metodi per una traduzione inversa di una sequenza amminoacidica includono lo strumento EMBOSS Protein Sequence Back-translation disponibile su <http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/>. In alcuni casi, una sequenza nucleotidica di un agente anti-VEGF è ottimizzata per i codoni utilizzando qualsiasi delle tecniche note nell'arte, per esempio, GenScript Codon Usage Frequency Table Tool a [http://www.genscript.com/tools/codon-frequency-table](http://www.genscript.com/tools/codon-frequency-table;); Codon Usage Database a <http://www.kazusa.or.jp/codon/>; e Nakamura, Y., et al. "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28:292 (2000).

25 **Composizioni farmaceutiche**

[0147] In alcuni casi, una composizione farmaceutica è una formulazione contenente uno o più principi attivi, per esempio, AAV2,7m8 comprendente una sequenza nucleotidica che codifica un agente anti-VEGF, o un suo frammento o una sua variante, così  
5 come uno o più eccipienti, veicolanti, stabilizzanti, o agenti di rigonfiamento, che sono adatti per la somministrazione a un paziente umano via un'iniezione intravitreale o subretinale per ottenere un effetto terapeutico o profilattico desiderato.

[0148] In alcuni casi, le composizioni farmaceutiche  
10 comprendenti rAAV, o AAV2,7m8 e una sequenza nucleotidica che codifica un agente anti-VEGF, vengono fornite come soluzione o sospensione ricostituita. In altri casi, le composizioni farmaceutiche comprendenti rAAV, o AAV2,7m8 e una sequenza nucleotidica che codifica un agente anti-VEGF, vengono fornite  
15 in una forma liofilizzata, e vengono ricostituite prima della somministrazione a un paziente. In alcuni casi, il metodo di trattamento o prevenzione di una malattia o di una condizione dell'occhio come descritto qui comprende prima ricostituire, sciogliere, o solubilizzare una composizione farmaceutica liofilizzata comprendente rAAV (per esempio AAV2,7m8) e una  
20 sequenza nucleotidica che codifica un agente anti-VEGF in un tampone. In alcuni casi, tale composizione farmaceutica liofilizzata comprendente rAAV (per esempio AAV2,7m8) e una sequenza nucleotidica che codifica un agente anti-VEGF come  
25 descritto qui, può anche comprendere un crioprotettore, un

tensioattivo, un sale, uno stabilizzante, o qualsiasi loro combinazione.

**[0149]** In alcuni casi, le composizioni farmaceutiche comprendenti rAAV, o AAV2,7m8 e una sequenza nucleotidica che  
5 codifica un agente anti-VEGF vengono fornite come sospensione. In alcuni casi, la sospensione viene refrigerata. In alcuni casi, la sospensione è una soluzione. In alcuni casi, una soluzione omogenea contenente la composizione farmaceutica viene fornita come siringa preriempita. In alcuni casi, le composizioni  
10 farmaceutiche descritte qui vengono fornite come sospensione. In alcuni casi, la sospensione viene refrigerata. In alcuni casi, il metodo di trattamento o prevenzione di una malattia o di una condizione dell'occhio come descritto qui comprende il riscaldare la sospensione refrigerata a temperatura ambiente e/o l'agitare  
15 la sospensione per garantire la distribuzione omogenea prima di somministrarla o iniettarla intravitrealmente a un paziente. In alcuni casi, la sospensione viene diluita prima di somministrarla a un paziente. In alcuni casi, tale composizione farmaceutica comprende un tensioattivo, un sale, uno stabilizzante, o  
20 qualsiasi loro combinazione. In alcuni casi, una sospensione contenente la composizione farmaceutica viene fornita come siringa preriempita.

**[0150]** In alcuni casi, la terapia genica o le composizioni farmaceutiche descritte qui vengono fornite come sospensione o  
25 come sospensione refrigerata. In alcuni casi, la sospensione

comprende un eccipiente farmaceuticamente accettabile, per esempio, tensioattivo, glicerolo, tensioattivo non ionico, tampone, glicole, sale, e qualsiasi loro combinazione. In alcuni casi, l'acido cloridrico e l'idrossido di sodio vengono  
5 utilizzati per regolare il pH della soluzione. In alcuni casi, la sospensione refrigerata è a un pH neutro, o a un pH tra il 6,5 e il 7,5. In alcuni casi, il pH della sospensione refrigerata è leggermente basico (per esempio un pH di circa 7,5, 8, 8,2, 8,4, 8,5, o 9). In alcuni casi, il pH della sospensione o  
10 soluzione refrigerata è leggermente acido (per esempio un pH di circa 6,5, 6,3, 6,1, 6, 5,5, o 5). In alcuni casi, la sospensione refrigerata è una soluzione. In alcuni casi, la sospensione refrigerata comprende micelle. In alcuni casi, la sospensione refrigerata viene agitata prima della somministrazione.

15 **[0151]** In alcuni casi, una terapia genica comprendente rAAV (per esempio AAV2,7m8) e un agente anti-VEGF come descritta qui viene fornita come corredo, comprendente la composizione farmaceutica liofilizzata o crioessiccata descritta qui e una soluzione tamponata per sciogliere, diluire o ricostituire la composizione  
20 farmaceutica liofilizzata. In alcuni casi, un corredo comprende una composizione farmaceutica liofilizzata o crioessiccata comprendente rAAV (per esempio AAV2,7m8) e una soluzione per ricostituire la composizione farmaceutica a una concentrazione o un volume desiderati. In alcuni casi, il corredo comprende un  
25 tampone che aiuta a prevenire l'aggregazione durante la

ricostituzione della composizione farmaceutica descritta qui. In alcuni casi, la terapia genica comprendente l'agente anti-VEGF viene fornita come sospensione. In alcuni casi, la composizione farmaceutica viene fornita in una siringa preriempita. In alcuni  
5 casi, un corredo comprende una siringa a due camere in cui una delle camere contiene un tampone per sciogliere o diluire la composizione farmaceutica.

[0152] In alcuni casi, il corredo comprende una siringa per l'iniezione. In alcuni casi, la soluzione ricostituita viene  
10 filtrata prima della somministrazione. In alcuni casi, il corredo comprende un filtro o un filtro a siringa per filtrare la composizione farmaceutica nel corredo prima della somministrazione a un paziente.

[0153] In alcuni casi, per la stabilità all'immagazzinamento e  
15 la comodità di manipolazione, una composizione farmaceutica, comprendente rAAV (per esempio AAV2,7m8) e una sequenza nucleotidica che codifica un agente anti-VEGF come descritto qui, può essere formulata come una polvere liofilizzata (cioè crioessiccata) o essiccata sottovuoto che può essere ricostituita  
20 con una soluzione salina, un tampone, o acqua prima della somministrazione a un soggetto. In alternativa, la composizione farmaceutica può essere formulata come una soluzione o una sospensione acquosa. Una composizione farmaceutica può contenere virioni rAAV o particelle comprendenti una sequenza nucleotidica  
25 che codifica un agente anti-VEGF come descritto qui. In alcuni

casi, un virus o un sistema di rilascio differente, per esempio, nanoparticelle o complessi basati su lipidi, possono essere utilizzati per rilasciare la sequenza di acidi nucleici che codifica un agente anti-VEGF come descritto qui. Vari eccipienti, quali tampone fosfato, PBS, o Tris, glicole, glicerolo, soluzione salina, tensioattivo (per esempio pluronic o polisorbato), o qualsiasi loro combinazione, possono essere utilizzati per stabilizzare una composizione farmaceutica. Inoltre, i crioprotettori, quali alcoli, DMSO, glicerolo, e PEG possono essere utilizzati come stabilizzanti nelle condizioni di congelamento o di essiccamento della liofilizzazione, o essere utilizzati come stabilizzanti per fare una sospensione refrigerata.

**[0154]** In alcuni casi, il liofilizzato o la sospensione della composizione farmaceutica, comprendente una terapia genica anti-VEGF come descritta qui, ha un volume (o un volume ricostituito) di circa 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, o 1000 µl. In alcuni casi, la forma liofilizzata o la sospensione della composizione farmaceutica, comprendente una terapia genica anti-VEGF come descritta qui, ha un volume tra 0,1 e 0,5 ml, tra 0,1 e 0,2 ml, tra 0,3 e 0,5 ml, tra 0,5 e 1,0 ml, tra 0,5 e 0,7 ml, tra 0,6 e 0,8 ml, tra 0,8 e 1 ml, tra 0,9 e 1,1 ml, tra 1,0 e 1,2, o tra 1,0 e 1,5 ml. In altri casi, il volume ricostituito non è superiore a circa 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4,

o 1,5 ml.

[0155] In alcuni casi, le composizioni farmaceutiche descritte qui vengono progettate, ingegnerizzate, o adattate per una somministrazione a un primate (per esempio a soggetti primati  
5 diversi dall'uomo e a soggetti umani) mediante iniezione intravitreale o subretinica. In alcuni casi, una composizione farmaceutica comprendente virioni rAAV comprendenti una sequenza nucleotidica che codifica un agente anti-VEGF viene formulata per l'iniezione intravitreale in un occhio di un soggetto. In  
10 alcuni casi, la composizione farmaceutica viene formulata a una concentrazione che permette l'iniezione intravitreale di un volume non superiore a circa 2, 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, o 200 µl. In alcuni casi, i  
15 metodi di trattamento descritti qui comprendono l'iniezione intravitreale di un volume di circa 2,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150 µl di una soluzione o di una sospensione comprendente un rAAV (per esempio AAV2,7m8) comprendente una  
20 sequenza nucleotidica che codifica un agente anti-VEGF come descritto qui.

[0156] In alcuni esempi, un virione AAV2,7m8 comprendente una sequenza nucleotidica del transgene anti-VEGF descritto qui può essere un componente di una composizione farmaceutica per la  
25 terapia genica. In alcuni casi, un virione rAAV di qualsiasi

sierotipo comprendente la proteina variante del capsido 7m8 come qui descritto può essere utilizzato per fare una composizione farmaceutica liofilizzata o una sospensione della composizione farmaceutica. In alcuni casi, il virione rAAV è l'rAAV2. In  
5 alcuni casi, la forma liofilizzata o la forma di sospensione della composizione farmaceutica comprende un rAAV2 avente una proteina variante del capsido 7m8 e una sequenza di DNA che codifica un agente anti-VEGF come descritto qui.

[0157] In alcuni casi, una composizione farmaceutica descritta  
10 qui viene adattata per una terapia genica o per un rilascio intravitreale di un agente anti-VEGF come agente terapeutico in pazienti umani o primati diversi dall'uomo. In alcuni casi, una dose unitaria della composizione farmaceutica comprende tra  $1 \times 10^{10}$  e  $1 \times 10^{13}$  genomi virali (vg). In alcuni casi, una dose  
15 unitaria comprende circa  $2,1 \times 10^{11}$ , circa  $2,1 \times 10^{12}$ , o circa  $2,1 \times 10^{13}$  genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria della composizione farmaceutica della descrizione è da  $1 \times 10^{10}$  a  $3 \times 10^{12}$  genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria della composizione farmaceutica della descrizione è da  $1 \times 10^9$  a  $3 \times 10^{13}$   
20 genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria della composizione farmaceutica della descrizione è da  $1 \times 10^{10}$  a  $1 \times 10^{11}$  genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria della composizione farmaceutica della descrizione è da  $1 \times 10^8$  a  $3 \times 10^{14}$  genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria della  
25 composizione farmaceutica della descrizione è almeno  $1 \times 10^1$ ,

$1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  
 $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ ,  $1 \times 10^{15}$ ,  $1 \times 10^{16}$ ,  $1 \times 10^{17}$ , o  $1 \times 10^{18}$  genomi  
vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria della composizione  
farmaceutica della descrizione è da  $1 \times 10^{10}$  a  $5 \times 10^{13}$  genomi  
5 vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria della composizione  
farmaceutica della descrizione è al massimo circa  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  
 $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ ,  $1 \times 10^{15}$ ,  $1 \times 10^{16}$ ,  $1 \times 10^{17}$ , e  $1 \times 10^{18}$   
genomi vettoriali.

**[0158]** In alcuni casi, una dose unitaria della composizione  
10 farmaceutica della descrizione può essere misurata come pfu  
(unità formanti placche). In alcuni casi, il pfu della dose  
unitaria della composizione farmaceutica della descrizione può  
essere da circa  $1 \times 10^8$  a circa  $1 \times 10^{12}$  pfu. In alcuni casi, il pfu  
della dose unitaria della composizione farmaceutica della  
15 descrizione può essere di almeno circa  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  
 $5 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  
 $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  
 $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  
 $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ ,  $9 \times 10^{11}$  o  $1 \times 10^{12}$  pfu. In alcuni casi, il pfu  
20 della dose unitaria della composizione farmaceutica della  
descrizione può essere al massimo circa  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$ ,  
 $5 \times 10^8$ ,  $6 \times 10^8$ ,  $7 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$ ,  $9 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  
 $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ ,  $9 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  
 $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  
25  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ ,  $9 \times 10^{11}$  o  $1 \times 10^{12}$  pfu.

[0159] In alcuni casi, il vettore virale della descrizione può essere misurato come genomi vettoriali (vg). In alcuni casi, la dose unitaria della composizione farmaceutica della descrizione può essere da  $1 \times 10^{10}$  a  $1 \times 10^{13}$  genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria della composizione farmaceutica della descrizione può essere da  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{14}$  genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria della composizione farmaceutica della descrizione può essere da  $1 \times 10^{10}$  a  $1 \times 10^{11}$  genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria della composizione farmaceutica della descrizione può essere da  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{15}$  genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria della composizione farmaceutica della descrizione è almeno  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ ,  $1 \times 10^{15}$ ,  $1 \times 10^{16}$ ,  $1 \times 10^{17}$  e  $1 \times 10^{18}$  genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria della composizione farmaceutica della descrizione è da  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{15}$  genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria della composizione farmaceutica della descrizione è al massimo circa  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ ,  $1 \times 10^{15}$ ,  $1 \times 10^{16}$ ,  $1 \times 10^{17}$  e  $1 \times 10^{18}$  genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria è tra  $10^{10}$  e  $10^{11}$ , tra  $10^{11}$  e  $10^{12}$ , tra  $10^{10}$  e  $10^{12}$ , tra  $10^{12}$  e  $10^{13}$ , tra  $10^{11}$  e  $10^{13}$ , tra  $10^{12}$  e  $10^{13}$ , tra  $10^{12}$  e  $10^{14}$ , tra  $10^{11}$  e  $10^{14}$ , tra  $10^{11}$  e  $10^{15}$ , tra  $10^{12}$  e  $10^{15}$ , tra  $10^{13}$  e  $10^{14}$ , tra  $10^{14}$  e  $10^{15}$ , tra  $10^{15}$  e  $10^{16}$ , tra  $10^{16}$  e  $10^{17}$ , tra  $10^{17}$  e  $10^{18}$ , tra  $10^{18}$  e  $10^{19}$ , o tra  $10^{19}$  e  $10^{20}$  genomi vettoriali.

[0160] In alcuni casi, la dose unitaria della composizione farmaceutica della descrizione è tra  $1 \times 10^{10}$  e  $2 \times 10^{10}$ , tra  $2 \times 10^{10}$  e  $3 \times 10^{10}$ , tra  $3 \times 10^{10}$  e  $4 \times 10^{10}$ , tra  $4 \times 10^{10}$  e  $5 \times 10^{10}$ , tra  $5 \times 10^{10}$  e  $6 \times 10^{10}$ , tra  $6 \times 10^{10}$  e  $7 \times 10^{10}$ , tra  $7 \times 10^{10}$  e  $8 \times 10^{10}$ , tra  $8 \times 10^{10}$  e  $9 \times 10^{10}$ , tra  
5  $9 \times 10^{10}$  e  $10 \times 10^{10}$ , tra  $1 \times 10^{11}$  e  $2 \times 10^{11}$ , tra  $2 \times 10^{11}$  e  $3 \times 10^{11}$ , tra  $2 \times 10^{11}$  e  $2,5 \times 10^{11}$ , tra  $2,5 \times 10^{11}$  e  $3 \times 10^{11}$ , tra  $3 \times 10^{11}$  e  $4 \times 10^{11}$ , tra  $4 \times 10^{11}$  e  $5 \times 10^{11}$ , tra  $5 \times 10^{11}$  e  $6 \times 10^{11}$ , tra  $6 \times 10^{11}$  e  $7 \times 10^{11}$ , tra  $7 \times 10^{11}$  e  $8 \times 10^{11}$ , tra  $8 \times 10^{11}$  e  $9 \times 10^{11}$ , tra  $9 \times 10^{11}$  e  $10 \times 10^{11}$ , tra  $1 \times 10^{10}$  e  $2 \times 10^{12}$ , tra  $2 \times 10^{12}$  e  $3 \times 10^{12}$ , tra  $2,5 \times 10^{12}$  e  $3 \times 10^{12}$ , tra  $3 \times 10^{12}$  e  $4 \times 10^{12}$ , tra  
10  $4 \times 10^{12}$  e  $5 \times 10^{12}$ , tra  $5 \times 10^{12}$  e  $6 \times 10^{12}$ , tra  $6 \times 10^{12}$  e  $7 \times 10^{12}$ , tra  $7 \times 10^{12}$  e  $8 \times 10^{12}$ , tra  $8 \times 10^{12}$  e  $9 \times 10^{12}$ , tra  $9 \times 10^{12}$  e  $10 \times 10^{12}$ , tra  $1 \times 10^{13}$  e  $2 \times 10^{13}$ , tra  $2 \times 10^{13}$  e  $3 \times 10^{13}$ , tra  $3 \times 10^{13}$  e  $4 \times 10^{13}$ , tra  $4 \times 10^{13}$  e  $5 \times 10^{13}$ , tra  $5 \times 10^{13}$  e  $6 \times 10^{13}$ , tra  $6 \times 10^{13}$  e  $7 \times 10^{13}$ , tra  $7 \times 10^{13}$  e  $8 \times 10^{13}$ , tra  $8 \times 10^{13}$  e  $9 \times 10^{13}$ , o tra  $9 \times 10^{13}$  e  $10 \times 10^{13}$  genomi vettoriali.

15 [0161] In alcuni casi, la dose unitaria di rAAV di questa descrizione è tra  $2 \times 10^{11}$  e  $8 \times 10^{11}$  o tra  $2 \times 10^{12}$  e  $8 \times 10^{12}$  genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria di rAAV di questa descrizione è tra  $10^{10}$  e  $10^{13}$ , tra  $10^{10}$  e  $10^{11}$ , tra  $10^{11}$  e  $10^{12}$ , tra  $10^{12}$  e  $10^{13}$ , o tra  $10^{13}$  e  $10^{14}$  genomi vettoriali.

20 [0162] In alcuni casi, la dose unitaria di rAAV di questa descrizione è tra  $1 \times 10^{10}$  e  $2 \times 10^{10}$ , tra  $2 \times 10^{10}$  e  $4 \times 10^{10}$ , tra  $3 \times 10^{10}$  e  $5 \times 10^{10}$ , tra  $4 \times 10^{10}$  e  $6 \times 10^{10}$ , tra  $5 \times 10^{10}$  e  $7 \times 10^{10}$ , tra  $6 \times 10^{10}$  e  $8 \times 10^{10}$ , tra  $7 \times 10^{10}$  e  $9 \times 10^{10}$ , tra  $8 \times 10^{10}$  e  $10^{11}$ , tra  $1 \times 10^{11}$  e  $2 \times 10^{11}$ , tra  $2 \times 10^{11}$  e  $4 \times 10^{11}$ , tra  $3 \times 10^{11}$  e  $5 \times 10^{11}$ , tra  $4 \times 10^{11}$  e  $6 \times 10^{11}$ , tra  
25  $5 \times 10^{11}$  e  $7 \times 10^{11}$ , tra  $6 \times 10^{11}$  e  $8 \times 10^{11}$ , tra  $7 \times 10^{11}$  e  $9 \times 10^{11}$ , tra  $8 \times 10^{11}$

e  $10 \times 10^{11}$ , tra  $1 \times 10^{12}$  e  $3 \times 10^{12}$ , tra  $2 \times 10^{12}$  e  $4 \times 10^{12}$ , tra  $3 \times 10^{12}$  e  $5 \times 10^{12}$ , tra  $4 \times 10^{12}$  e  $6 \times 10^{12}$ , tra  $5 \times 10^{12}$  e  $7 \times 10^{12}$ , tra  $6 \times 10^{12}$  e  $8 \times 10^{12}$ , tra  $7 \times 10^{12}$  e  $9 \times 10^{12}$ , tra  $8 \times 10^{12}$  e  $10 \times 10^{12}$ , tra  $1 \times 10^{13}$  e  $5 \times 10^{13}$ , tra  $5 \times 10^{13}$  e  $10 \times 10^{13}$ , tra  $10^{12}$  e  $5 \times 10^{12}$ , tra  $5 \times 10^{12}$  e  $1 \times 10^{13}$ , tra  $7 \times 10^{12}$  e  $1 \times 10^{13}$ , tra  $8 \times 10^{12}$  e  $2 \times 10^{13}$ , tra  $9 \times 10^{12}$  e  $2 \times 10^{13}$ , tra  $9 \times 10^{12}$  e  $2 \times 10^{13}$ , tra  $9 \times 10^{12}$  e  $4 \times 10^{13}$ , tra  $1 \times 10^{13}$  e  $3 \times 10^{13}$ , tra  $1 \times 10^{13}$  e  $2 \times 10^{13}$ , tra  $2 \times 10^{13}$  e  $3 \times 10^{13}$ , tra  $3 \times 10^{13}$  e  $4 \times 10^{13}$ , tra  $4 \times 10^{13}$  e  $5 \times 10^{13}$ , tra  $5 \times 10^{13}$  e  $6 \times 10^{13}$ , tra  $6 \times 10^{13}$  e  $7 \times 10^{13}$ , tra  $7 \times 10^{13}$  e  $8 \times 10^{13}$ , tra  $8 \times 10^{13}$  e  $9 \times 10^{13}$ , o tra  $8 \times 10^{13}$  e  $1 \times 10^{14}$  genomi vettoriali.

10 **[0163]** In alcuni casi, vengono scelti una quantità o un intervallo inferiore di genomi vettoriali per una dose unitaria per evitare l'aggregazione. In alcuni casi, vengono scelti una quantità o un intervallo più elevati di genomi vettoriali per una dose unitaria così che un volume più piccolo possa essere  
15 utilizzato per l'iniezione. Un volume inferiore (per esempio inferiore a 50, 40, 30, 20, 10, o 5  $\mu$ l) di iniezione può aiutare a ridurre le variazioni nella pressione oculare e altri effetti avversi associati all'iniezione intravitreale. In alcuni casi, una concentrazione superiore di rAAV aiuta anche per garantire  
20 un rilascio efficiente del transgene terapeutico nelle cellule bersaglio.

**[0164]** In alcuni casi, una dose unitaria comprende i genomi vettoriali da  $2E12$  a  $6E12$ . In alcuni casi, una dose unitaria comprende circa  $1E12$ ,  $1,5E12$ ,  $2E12$ ,  $2,5E12$ ,  $3E12$ ,  $3,5E12$ ,  $4E12$ ,  
25  $4,5E12$ ,  $5E12$ ,  $5,5E12$ ,  $6E12$ ,  $6,5E12$ ,  $7E12$ ,  $7,5E12$ ,  $8E12$ ,  $8,5E12$ ,

9E12, o 9,5E12 genomi vettoriali. In alcuni casi, una dose unitaria comprende tra 1E12 e 1,5E12, tra 1,5E12 e 2E12, tra 2E12 e 2,5E12, tra 2,5E12 e 3,0E12, tra 3,0E12 e 3,5E12, tra 3,5E12 e 4,0E12, tra 4,0E12 e 4,5E12, tra 4,5E12 e 5,0E12, tra 5,0E12 e 5,5E12, tra 5,5E12 e 6,0E12, tra 6,0E12 e 6,5E12, tra 6,5E12 e 7,0E12, tra 7,0E12 e 7,5E12, tra 7,5E12 e 8,0E12, tra 8,0E12 e 8,5E12, tra 8,5E12 e 9,0E12, tra 9,0E12 e 9,5E12, o tra 9,5E12 e 10E12 genomi vettoriali. In alcuni casi, una dose unitaria comprende almeno 1E12, 1,5E12, 2E12, 2,5E12, 3E12, 3,5E12, 4E12, 4,5E12, 5E12, 5,5E12, 6E12, 6,5E12, 7E12, 7,5E12, 8E12, 8,5E12, 9E12, o 9,5E12 genomi vettoriali. In alcuni casi, una dose unitaria comprende non più di 1E12, 1,5E12, 2E12, 2,5E12, 3E12, 3,5E12, 4E12, 4,5E12, 5E12, 5,5E12, 6E12, 6,5E12, 7E12, 7,5E12, 8E12, 8,5E12, 9E12, o 9,5E12 genomi vettoriali.

15 **[0165]** In alcuni casi, la dose unitaria della composizione farmaceutica della descrizione può essere misurata utilizzando la molteplicità di infezione (MOI). In alcuni casi, una MOI può riferirsi al rapporto, o ai multipli dei genomi vettoriali o virali delle cellule alle quali può essere rilasciato l'acido nucleico. In alcuni casi, la MOI può essere  $1 \times 10^6$ . In alcuni casi, la MOI può essere tra circa  $1 \times 10^5$  e circa  $1 \times 10^7$ . In alcuni casi, la MOI può essere  $1 \times 10^4$  e  $1 \times 10^8$ . In alcuni casi, i virus ricombinanti della descrizione possono essere almeno circa  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ ,  $1 \times 10^{15}$ ,  $1 \times 10^{16}$ ,  $1 \times 10^{17}$  e  $1 \times 10^{18}$  MOI.

In alcuni casi, i virus ricombinanti di questa descrizione possono essere da circa  $1 \times 10^8$  a circa  $1 \times 10^{15}$  MOI. In alcuni casi, i virus ricombinanti della descrizione possono essere al massimo circa  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  
5  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ ,  $1 \times 10^{15}$ ,  $1 \times 10^{16}$ ,  $1 \times 10^{17}$  e  $1 \times 10^{18}$  MOI. In alcuni casi, la MOI è tra  $1 \times 10^{10}$  e  $2 \times 10^{10}$ , tra  $2 \times 10^{10}$  e  $4 \times 10^{10}$ , tra  $3 \times 10^{10}$  e  $5 \times 10^{10}$ , tra  $4 \times 10^{10}$  e  $6 \times 10^{10}$ , tra  $5 \times 10^{10}$  e  $7 \times 10^{10}$ , tra  $6 \times 10^{10}$  e  $8 \times 10^{10}$ , tra  $7 \times 10^{10}$  e  $9 \times 10^{10}$ , tra  $8 \times 10^{10}$  e  $10^{11}$ , tra  $1 \times 10^{11}$  e  $2 \times 10^{11}$ , tra  $2 \times 10^{11}$  e  $4 \times 10^{11}$ , tra  $3 \times 10^{11}$  e  $5 \times 10^{11}$ , tra  $4 \times 10^{11}$   
10 e  $6 \times 10^{11}$ , tra  $5 \times 10^{11}$  e  $7 \times 10^{11}$ , tra  $6 \times 10^{11}$  e  $8 \times 10^{11}$ , tra  $7 \times 10^{11}$  e  $9 \times 10^{11}$ , tra  $8 \times 10^{11}$  e  $10 \times 10^{11}$ , tra  $1 \times 10^{12}$  e  $3 \times 10^{12}$ , tra  $2 \times 10^{12}$  e  $4 \times 10^{12}$ , tra  $3 \times 10^{12}$  e  $5 \times 10^{12}$ , tra  $4 \times 10^{12}$  e  $6 \times 10^{12}$ , tra  $5 \times 10^{12}$  e  $7 \times 10^{12}$ , tra  $6 \times 10^{12}$  e  $8 \times 10^{12}$ , tra  $7 \times 10^{12}$  e  $9 \times 10^{12}$ , tra  $8 \times 10^{12}$  e  $10 \times 10^{12}$ , tra  $1 \times 10^{13}$  e  $5 \times 10^{13}$ , tra  $5 \times 10^{13}$  e  $10 \times 10^{13}$ , tra  $10^{12}$  e  $5 \times 10^{12}$ , tra  $5 \times 10^{12}$  e  $1 \times 10^{13}$ ,  
15 tra  $7 \times 10^{12}$  e  $1 \times 10^{13}$ , tra  $8 \times 10^{12}$  e  $2 \times 10^{13}$ , tra  $9 \times 10^{12}$  e  $2 \times 10^{13}$ , tra  $9 \times 10^{12}$  e  $2 \times 10^{13}$ , tra  $9 \times 10^{12}$  e  $4 \times 10^{13}$ , tra  $1 \times 10^{13}$  e  $3 \times 10^{13}$ , tra  $1 \times 10^{13}$  e  $2 \times 10^{13}$ , tra  $2 \times 10^{13}$  e  $3 \times 10^{13}$ , tra  $3 \times 10^{13}$  e  $4 \times 10^{13}$ , tra  $4 \times 10^{13}$  e  $5 \times 10^{13}$ , tra  $5 \times 10^{13}$  e  $6 \times 10^{13}$ , tra  $6 \times 10^{13}$  e  $7 \times 10^{13}$ , tra  $7 \times 10^{13}$  e  $8 \times 10^{13}$ , tra  $8 \times 10^{13}$  e  $9 \times 10^{13}$ , o tra  $8 \times 10^{13}$  e  $1 \times 10^{14}$ .

20 **[0166]** Le composizioni farmaceutiche adatte per l'uso oculare includono soluzioni o dispersioni acquose sterili e polveri sterili per la preparazione estemporanea di soluzioni, sospensioni, o dispersioni iniettabili sterili. Per la somministrazione intravitreale, veicolanti adatti includono una  
25 soluzione salina fisiologica, un'acqua batteriostatica, una

soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), e/o un agente isotonico, per esempio, il glicerolo. In ogni caso, la composizione farmaceutica deve essere sterile e dovrebbe essere fluida al punto tale da essere facile l'applicazione con la  
5 siringa o l'iniettabilità. Deve essere stabile nelle condizioni di produzione e di conservazione e deve essere preservata nei confronti dell'azione contaminante di microrganismi quali batteri e funghi. In alcuni casi, la composizione farmaceutica può includere un agente isotonico, quale sale o glicerolo. In  
10 alcuni casi, viene aggiunto un tensioattivo o uno stabilizzante alla composizione farmaceutica per prevenire l'aggregazione.

**[0167]** In alcuni esempi, l'eccipiente può essere un veicolante. Un veicolante può essere un solvente o un mezzo di dispersione contenente, per esempio, acqua, soluzione salina, etanolo, un  
15 poliolo (per esempio glicerolo, propilenglicole e polietilenglicole liquido, e simili), e qualsiasi loro combinazione. L'adeguata fluidità può essere mantenuta, per esempio, mediante l'uso di un rivestimento quale la lecitina, mediante il mantenimento della granulometria richiesta nel caso  
20 di dispersione e mediante l'uso di tensioattivi quali polisorbati (per esempio Tween™, polisorbato 20, polisorbato 80), dodecilsolfato di sodio (laurilsolfato di sodio), ossido di laurildimetilammina, bromuro di cetiltrimetilammonio (CTAB), alcoli polietossilati, poliossietilensorbitano, ottossinolo  
25 (Triton X-100™), N,N-dimetildodecilammina-N-ossido,

esadeciltrimetilbromuro d'ammonio (HTAB), poliossil 10  
lauriletere, Brij 721™, sali biliari (deossicolato di sodio,  
colato di sodio), acidi pluronici (F-68, F-127), olio di ricino  
poliossilico (Cremophor™) nonilfenolo etossilato (Tergitol™),  
5 ciclodestrine e, cloruro di etilbenzetonio (Hyamine™). La  
prevenzione dell'azione di microrganismi può essere ottenuta  
mediante vari agenti antibatterici e antifungini, per esempio,  
parabeni, clorobutanolo, fenolo, cresolo, acido ascorbico,  
timerosal, e simili. In molti casi, sarà preferibile includere  
10 agenti isotonici, per esempio, zuccheri, polialcololi quali  
mannitolo, sorbitolo, cloruro di sodio nella composizione.  
L'assorbimento prolungato delle composizioni a livello interno  
può essere veicolato comprendendo nella composizione un agente  
che ritarda l'assorbimento, per esempio, monostearato di  
15 alluminio e gelatina. In alcuni casi, il veicolante farmaceutico  
comprende fosfato di sodio, cloruro di sodio, polisorbato, e  
saccarosio. In alcuni casi, una composizione farmaceutica  
comprende un tensioattivo, per esempio, un tensioattivo non  
ionico quali polisorbato, polossamero, o pluronic. In alcuni  
20 casi, l'aggiunta di un tensioattivo non ionico riduce  
l'aggregazione in una sospensione o una soluzione.

**[0168]** In alcuni casi, le composizioni farmaceutiche utili per  
la presente descrizione possono essere confezionate in un corredo  
per facilitare l'applicazione della presente descrizione. In  
25 alcuni aspetti, il presente metodo fornisce un corredo

comprendente un acido nucleico ricombinante (per esempio un rAAV  
comprendente la sequenza di acidi nucleici di un agente anti-  
VEGF) della descrizione. In alcuni aspetti, il presente metodo  
fornisce un corredo comprendente una forma liofilizzata di un  
5 virus ricombinante della descrizione e una soluzione per  
ricostituire il virus prima della somministrazione a un paziente.  
In alcuni casi, il corredo comprende una forma di sospensione  
del virus ricombinante della descrizione e una soluzione per  
diluire la sospensione. In alcuni casi, la sospensione viene  
10 fornita in una siringa preriempita. In alcuni casi, la  
sospensione o il suo corredo vengono refrigerati. In alcuni casi,  
la sospensione viene scaldata a temperatura ambiente prima della  
somministrazione. In alcuni casi, la sospensione viene agitata  
per garantire una distribuzione omogenea prima della  
15 somministrazione.

**[0169]** In alcuni casi, un corredo comprende: un virus  
ricombinante fornito qui, e istruzioni per somministrare a un  
occhio o alle cellule retiniche di un soggetto una quantità  
terapeuticamente efficace del virus ricombinante. In alcuni  
20 aspetti, il corredo comprende sali o soluzioni farmaceuticamente  
accettabili per somministrare il virus ricombinante.  
Facoltativamente, il corredo può comprendere inoltre istruzioni  
per parametri operativi adatti in forma di un'etichetta o di un  
inserto separato. Per esempio, il corredo può avere istruzioni  
25 standard che informano un medico o un tecnico di laboratorio

sulla preparazione di una dose unitaria di un virus ricombinante da una soluzione o da una sospensione e/o sulla ricostituzione delle composizioni liofilizzate. In alcuni casi, il corredo comprende inoltre, facoltativamente, un dispositivo per la  
5 somministrazione, quali una siringa, un ago con filtro, un tubo di prolunga, una cannula, o un iniettore subretinale.

[0170] In alcuni casi, la composizione farmaceutica viene fornita come sospensione refrigerata. In alcuni casi, la sospensione refrigerata viene fornita in un corredo, che può  
10 includere una siringa e/o un tampone per la diluizione. In alcuni casi, la sospensione refrigerata viene fornita come siringa preriempita.

[0171] In alcuni casi, può essere utilizzato qualsiasi metodo adatto nella purificazione biochimica di un virus ricombinante  
15 (per esempio un rAAV) per l'uso in una composizione farmaceutica come descritta qui. I virus AAV ricombinanti possono essere raccolti direttamente dalle cellule, o dai terreni di coltura comprendenti le cellule. Il virus può essere purificato utilizzando vari metodi biochimici, quale la permeazione su gel,  
20 la filtrazione, la cromatografia, la purificazione per affinità, l'ultracentrifugazione a gradiente, o metodi di esclusione dimensionale prima di liofilizzare o fare una sospensione del virus rAAV.

### **Indicazioni**

25 [0172] In alcuni casi, un virione rAAV di qualsiasi sierotipo

comprendente una proteina variante del capsido e un transgene terapeutico, o una sua composizione farmaceutica come descritta qui può migliorare almeno parzialmente una condizione o una malattia oculare associata alla neovascolarizzazione dell'occhio, o associata alla CNV. In alcuni casi, un virione rAAV comprendente una proteina variante del capsido viene utilizzato per rilasciare un transgene anti-VEGF in un occhio di un soggetto umano.

[0173] Le indicazioni per la terapia genica o le composizioni farmaceutiche descritte qui includono la degenerazione maculare neovascolare (umida) legata all'età (DMLU), l'edema maculare secondario ad occlusione della vena retinica (RVO), l'edema maculare diabetico (DME), l'occlusione della vena retinica, e la retinopatia diabetica (RD) in pazienti con DME. In alcuni casi, i metodi e le composizioni farmaceutiche descritti qui possono essere utilizzati per prevenire o per trattare una condizione o una malattia oculare per la quale un transgene anti-VEGF viene approvato o indicato. In alcuni casi, una terapia genica (per esempio una terapia genica basata su AAV2,7m8) viene utilizzata per trattare o per prevenire una condizione o una malattia oculare che è sensibile ad almeno una cura attuale standard per la condizione oculare/malattia comprendente, ma senza limitazione, CNV, DMLU umida, DMLU secca, edema maculare secondario ad RVO, DME, e retinopatia diabetica in pazienti con DME. In alcuni casi, viene utilizzata una terapia genica rAAV

per trattare o per prevenire qualsiasi condizione o disturbo oculare caratterizzati da neovascolarizzazione o CNV. In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce composizioni farmaceutiche fornite qui per il trattamento di malattie quali, per esempio: DMLE, DME, RVO, malattie correlate all'angiogenesi, cancro, malattie autoimmuni, organismi di malattie infettive, e simili.

**[0174]** In alcuni casi, la condizione oculare può essere un edema maculare diabetico. L'edema maculare diabetico (DME) è un rigonfiamento della retina nel diabete mellito causato dalla perdita di fluido dai vasi sanguigni all'interno della macula. La macula è la porzione centrale della retina, una piccola area ricca in coni, terminazioni nervose specializzate che rilevano i colori e da cui dipende la visione diurna. Quando si sviluppa l'edema maculare, l'annebbiamento si verifica al centro o appena a lato del campo visivo centrale. La perdita della vista dall'edema maculare diabetico può progredire nel corso di mesi e rendere impossibile mettere a fuoco chiaramente. Sintomi comuni di DME sono visione sfocata, miodesopsie, visione doppia, e infine cecità se non viene trattato. In alcuni casi, i metodi e le composizioni farmaceutiche come descritti qui vengono utilizzati per trattare il DME.

**[0175]** In alcuni casi, la condizione oculare può essere un'occlusione della vena retinica. L'occlusione della vena retinica è un blocco delle piccole vene che portano il sangue

lontano dalla retina. La retina è lo strato di tessuto nella parte posteriore dell'occhio interno che converte le immagini luminose in segnali nervosi che invia al cervello. L'occlusione della vena retinica è più spesso causata dall'indurimento delle  
5 arterie (aterosclerosi) e dalla formazione di un coagulo di sangue. Il blocco delle vene più piccole (vene di ramificazione o BRVO) nella retina spesso avviene in luoghi dove le arterie retiniche che sono state ispessite o indurite dall'aterosclerosi si incrociano e fanno pressione su una vena retinica. I sintomi  
10 dell'occlusione della vena retinica possono includere un rapido annebbiamento o una perdita della vista in tutta o una parte di un occhio. In alcuni casi, i metodi e le composizioni farmaceutiche come descritti qui vengono utilizzati per trattare l'occlusione della vena retinica.

15 **[0176]** In alcuni casi, la condizione oculare può essere la neovascolarizzazione coroidea (CNV), nota anche come DMLE umida. La neovascolarizzazione coroidea può implicare la crescita di nuovi vasi sanguigni che originano dalla coroide attraverso una rottura nella membrana di Bruch nell'epitelio pigmentato  
20 subretinico (sub-RPE) o spazio sottoretinico, che può essere una causa importante di perdita della vista. La CNV può creare un rapido deterioramento della visione centrale, visibile entro alcune settimane. Altri sintomi che si possono verificare includono disturbi del colore, e metamorfopsia (distorsioni in  
25 cui le linee dritte appaiono ondulate). L'emorragia dei nuovi

vasi sanguigni può accelerare la comparsa di sintomi di CNV. La CNV può anche includere una sensazione di pressione dietro l'occhio. In alcuni casi, i metodi e le composizioni farmaceutiche come descritti qui vengono utilizzati per trattare  
5 la CNV o una condizione oculare associata alla neovascolarizzazione.

**[0177]** La forma avanzata "umida" (neovascolare o essudativa) di DMLE è meno comune, ma può frequentemente causare una rapida e spesso sostanziale perdita della visione centrale in pazienti.  
10 Nella forma umida di DMLE, la neovascolarizzazione coroidea si forma e si sviluppa in una rete di vasi che possono crescere sotto e attraverso l'epitelio pigmentato retinico. Poiché questa è accompagnata da una perdita di plasma e/o da emorragia nello spazio sottoretinico, ci potrebbe essere una grave perdita  
15 improvvisa della visione centrale se questa avviene nella macula. Il termine "DMLE", se non specificato diversamente, può essere DMLE secca o DMLE umida. La presente descrizione contempla il trattamento o la prevenzione di DMLE, DMLE umida e/o DMLE secca. In alcuni casi, i metodi e le composizioni farmaceutiche come  
20 descritti qui vengono utilizzati per trattare la DMLE.

**[0178]** In alcuni casi, i metodi e le composizioni farmaceutiche come descritti qui vengono utilizzati per prevenire o per trattare una malattia o una condizione dell'occhio che è sensibile ad almeno una delle terapie di cura standard o terapie  
25 approvate attuali, quali ranibizumab o bevacizumab. In alcuni

casi, un paziente è stato sottoposto a un trattamento precedente con uno qualsiasi tra ranibizumab, bevacizumab, e qualsiasi altra sostanza terapeutica approvata per una malattia o una condizione dell'occhio, o qualsiasi loro combinazione, prima di ricevere o  
5 qualificarsi per la somministrazione di una terapia genica anti-VEGF.

**[0179]** In alcuni casi, i metodi e le composizioni farmaceutiche descritti qui, cioè, una terapia genica di AAV comprendente un agente anti-VEGF, portano a una riduzione della  
10 neovascolarizzazione o della CNV, come misurato dalla percentuale delle lesioni di grado IV in seguito alla formazione di CNV secondo le fotografie a colori del fondo oculare, di almeno il 5%, almeno il 6%, almeno il 7%, almeno l'8%, almeno il 9%, almeno il 10%, almeno l'11%, almeno il 12%, almeno il 13%, almeno il  
15 14%, almeno il 15%, almeno il 16%, almeno il 17%, almeno il 18%, almeno il 19%, almeno il 20%, almeno il 25%, almeno il 30%, almeno il 35%, almeno il 40%, almeno il 45%, almeno il 50%, almeno il 55%, almeno il 60%, almeno il 65%, almeno il 70%, almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85%, almeno il 90%, almeno  
20 il 95%, o di almeno il 100% in confronto a un veicolo o un tampone di controllo.

**[0180]** In alcuni casi, i metodi e le composizioni farmaceutiche descritti qui, cioè, una terapia genica di AAV comprendente un agente anti-VEGF, portano a una riduzione della  
25 neovascolarizzazione o della CNV, come misurato dalla percentuale

delle lesioni di grado IV in seguito alla formazione di CNV secondo le fotografie a colori del fondo oculare, che è paragonabile a una terapia approvata. In alcuni casi, la riduzione di CNV, o l'effetto terapeutico, dura più a lungo con la somministrazione di una terapia genica comprendente un agente anti-VEGF in confronto a un'iniezione a base di una terapia non genica o un'iniezione di proteine.

**[0181]** In alcuni casi, un virione rAAV o una sua composizione farmaceutica può migliorare almeno parzialmente una condizione, una malattia oculare, o loro combinazioni. In alcuni esempi, la condizione o la malattia oculare può essere associata alla neovascolarizzazione dell'occhio. In alcuni casi, la condizione o la malattia oculare è qualsiasi condizione o malattia sensibile a o trattabile con un agente anti-VEGF della presente descrizione.

**[0182]** In alcuni casi, una terapia genica come descritta qui viene utilizzata per trattare qualsiasi malattia o condizione dell'occhio riguardante la neovascolarizzazione anormale, per esempio, come risultato di un'attività o un'espressione anormale di VEGF e/o VEGFR, DMLE, retinopatia diabetica, e preeclampsia. In alcuni casi, un agente anti-VEGF in una terapia genica è un agente che inibisce o interferisce con un membro della famiglia VEGF dei mammiferi, che comprende VEGF-A, B, C, D, e il fattore di crescita della placenta (PlGF), o qualsiasi loro combinazione o variante. In alcuni casi, un agente anti-VEGF in una terapia

genica è un agente che inibisce o interferisce con una qualsiasi delle proteine correlate a VEGF, per esempio, il VEGF-E espresso da alcuni virus e il VEGF-F trovato nel veleno di alcuni serpenti, che può anche avere proprietà terapeutiche per ulteriori  
5 indicazioni relative all'angiogenesi in vivo. In alcuni casi, l'agente anti-VEGF può anche interferire con, legare, o inibire il fattore di crescita placentare (PIGF) in vivo.

#### **Metodi d'uso**

[0183] In alcuni casi, la presente descrizione fornisce un metodo  
10 per il trattamento di una malattia oculare correlata all'angiogenesi patologica, comprendente la somministrazione di una quantità farmaceuticamente efficace delle composizioni farmaceutiche fornite qui a un soggetto umano che necessiti di tale trattamento. In alcuni casi, la malattia viene scelta dal  
15 gruppo delle malattie neovascolari oculari comprendenti la degenerazione maculare legata all'età (DMLE), la DMLE umida, la DMLE secca, la neovascolarizzazione retinica, la neovascolarizzazione coroidea, la retinopatia diabetica, la retinopatia diabetica proliferativa, l'occlusione della vena  
20 retinica, l'occlusione venosa retinica centrale, l'occlusione venosa retinica di branca, l'edema maculare diabetico, l'ischemia diabetica della retina, la retinopatia ischemica e l'edema retinico diabetico, e qualsiasi loro combinazione.

[0184] In alcuni casi, le composizioni farmaceutiche  
25 comprendenti un rAAV comprendente una proteina variante del

capside (per esempio rAAV,7m8) e una sequenza nucleotidica che codifica un agente anti-VEGF vengono utilizzate per trattare o per prevenire la DMLE, che comprende la DMLE secca e la DMLE umida. In alcuni casi, le composizioni farmaceutiche comprendenti un rAAV comprendente una proteina variante del capsid (per esempio rAAV,7m8) e una sequenza nucleotidica che codifica un agente anti-VEGF, vengono utilizzate per trattare o per prevenire la CNV, o per ridurre le lesioni di grado IV di CNV. In alcuni casi, le composizioni farmaceutiche comprendenti un rAAV comprendente una proteina variante del capsid (per esempio rAAV,7m8) e una sequenza nucleotidica che codifica un agente anti-VEGF, vengono utilizzate per trattare o per prevenire una qualsiasi tra DMLE, DMLE umida, DMLE secca, neovascolarizzazione retinica, neovascolarizzazione coroidea, retinopatia diabetica, retinopatia diabetica proliferativa, occlusione della vena retinica, occlusione venosa retinica centrale, occlusione venosa retinica di branca, RVO, edema maculare diabetico, ischemia diabetica della retina, retinopatia ischemica ed edema retinico diabetico, RD in pazienti con DME, e qualsiasi loro combinazione.

20 **[0185]** In alcuni casi, il metodo per trattare la DMLE, il DME, l'RVO oppure l'RD comprende il pretrattamento di un paziente con una terapia approvata, per esempio, un'iniezione di ranibizumab o bevacizumab, prima di somministrare una terapia genica comprendente una sequenza nucleotidica dell'agente anti-VEGF, per esempio, ranibizumab o bevacizumab, allo stesso paziente. In

alcuni casi, un paziente viene sottoposto a un trattamento precedente con una terapia approvata prima di ricevere un'unica dose della terapia genica anti-VEGF, come descritto qui. In alcuni casi, un paziente è sensibile a una qualsiasi iniezione tra ranibizumab o bevacizumab prima di ricevere un'unica dose della terapia genica anti-VEGF, come descritto qui. In alcuni casi, un paziente che è sensibile a uno qualsiasi tra ranibizumab o bevacizumab, o che è stato sottoposto a un trattamento precedente con ranibizumab o bevacizumab, viene trattato con una terapia genica di ranibizumab o bevacizumab, come descritto qui, cui segue un periodo di almeno 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o più anni, o più di 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o più anni durante il quale il paziente non riceve nessuno di questi trattamenti per DMLE. In alcuni casi, dopo che un paziente riceve un'iniezione intravitreale di ranibizumab o una terapia genica di bevacizumab, il paziente non riceve iniezioni proteiche di ranibizumab o bevacizumab o di un'altra terapia approvata fino a quando non siano trascorsi almeno 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o più anni.

20 **[0186]** In alcuni casi, una terapia genica di ranibizumab o bevacizumab, o qualsiasi altra terapia genica anti-VEGF, come viene descritta qui è una somministrazione singola. In alcuni casi, dopo che un paziente riceve una dose unitaria di una terapia genica di ranibizumab o bevacizumab descritta qui, il paziente non ha bisogno di utilizzare nessun'altra sostanza terapeutica

approvata a base di proteine.

[0187] In alcuni casi, i pazienti che presentano effetti avversi associati a iniezioni ripetute di terapie approvate per CNV o DMLE, per esempio, infiammazione o infezione batterica, possono  
5 essere candidati per il trattamento con la terapia genica anti-VEGF, o con una terapia genica di ranibizumab o bevacizumab, come descritto qui. In alcuni casi, tali rischi sono inferiori nella terapia genica poiché la terapia genica richiede solo un'iniezione nella vita di un paziente, oppure viene  
10 somministrata non più di una volta in almeno 2,5, 10, 20, 30, 40, o 50 anni. In alcuni casi, il trattamento con la terapia genica anti-VEGF, o con una terapia genica di ranibizumab o bevacizumab, come descritto qui, può essere più economico rispetto alle iniezioni a base di proteine poiché gli effetti  
15 terapeutici di una terapia genica possono durare più a lungo e il costo di un'unica iniezione di terapia genica può essere inferiore al costo combinato di iniezioni multiple, ripetute di una proteina.

[0188] Inoltre, non richiedendo iniezioni ripetute, la terapia  
20 genica affronta il problema della conformità e dell'aderenza del paziente associato a terapie che richiedono iniezioni ripetute, poiché la non accettazione (per esempio quando un paziente dimentica o salta una o più iniezioni programmate) può provocare la perdita della vista e il deterioramento della malattia o della  
25 condizione dell'occhio. Il tasso di non conformità e non adesione

ai regimi di trattamento che richiedono viaggi ripetuti o frequenti agli studi medici per la somministrazione è superiore tra i pazienti anziani, che sono i più colpiti da DMLE. Quindi, rilasciando un agente anti-VEGF in un occhio di un paziente  
5 tramite terapia genica, per esempio, come unica iniezione intravitreale, può fornire un'alternativa di trattamento più comoda per i pazienti e migliorare i risultati dei pazienti affrontando il problema della non conformità e non adesione.

[0189] In alcuni casi, un metodo di uso comprende il  
10 pretrattamento di un paziente o un soggetto umano con un farmaco approvato che è considerato la terapia standard attuale, per esempio, iniezione di ranibizumab, o iniezione di bevacizumab, la determinazione della sensibilità del paziente al ranibizumab o al bevacizumab, e la somministrazione della terapia genica  
15 anti-VEGF descritta qui al paziente che è sensibile a una terapia approvata. La determinazione della sensibilità di un paziente a una terapia approvata o a una cura attuale standard può includere, ma senza limitazione, esami del sangue, dosaggio immunologico, esperimenti ex vivo, o la somministrazione di  
20 un'iniezione proteica di ranibizumab o bevacizumab al paziente e il saggiare la sensibilità del paziente a ranibizumab o bevacizumab.

[0190] In alcuni casi, il metodo di uso della terapia genica anti-VEGF descritta qui comprende la ricostituzione di una forma  
25 liofilizzata della composizione farmaceutica descritta qui

(cioè, rAAV2,7m8 comprendente una sequenza anti-VEGF di acidi nucleici) secondo l'etichetta del farmaco e la somministrazione della suddetta terapia genica anti-VEGF ricostituita a un soggetto o a un paziente umano. In alcuni casi, il metodo di uso  
5 della terapia genica anti-VEGF descritta qui comprende la somministrazione di una sospensione della composizione farmaceutica descritta qui secondo l'etichetta del farmaco e la somministrazione della suddetta sospensione della terapia genica anti-VEGF a un soggetto o a un paziente umano. In alcuni casi,  
10 passaggi ulteriori per la somministrazione di una sospensione includono agitare la sospensione prima dell'uso e/o riscaldare la sospensione a temperatura ambiente.

**[0191]** In alcuni casi, tale paziente umano è stato sottoposto a un trattamento precedente con un'iniezione proteica approvata o  
15 una terapia standard attuale, per esempio, un'iniezione di ranibizumab o un'iniezione di bevacizumab. In alcuni casi, tale paziente riceve non più di un'iniezione o somministrazione della terapia genica rAAV2,7m8-ranibizumab per almeno 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o più anni; oppure riceve non più di un'iniezione o  
20 somministrazione della terapia genica rAAV2,7m8-ranibizumab per più di 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o più anni.

**[0192]** In alcuni casi, vengono descritti qui anche i metodi per prevenire o per trattare una condizione o malattia oculare, il metodo comprendente la somministrazione a un individuo che lo  
25 richiede, per esempio, un individuo con una condizione o una

malattia oculare sensibile a un farmaco approvato, di una  
quantità efficace di un virione rAAV comprendente una sequenza  
nucleotidica che codifica un agente anti-VEGF, per esempio,  
ranibizumab o bevacizumab, come descritto qui o una sua  
5 composizione farmaceutica. In alcuni casi, il virione rAAV2,7m8-  
ranibizumab può essere somministrato mediante iniezione  
intraoculare, mediante iniezione intravitreale, mediante  
iniezione subretinica, o mediante qualsiasi altra modalità o via  
di somministrazione comoda in un occhio di un individuo. Altri  
10 modi o vie di somministrazione comodi possono includere, per  
esempio, endovenosa, topica, colliri, ecc. In alcuni casi, i  
metodi e le composizioni farmaceutiche descritti qui implicano  
la somministrazione mediante iniezione intravitreale.

**[0193]** Una "quantità terapeuticamente efficace" come qui  
15 descritta può essere un intervallo relativamente ampio che può  
essere determinato attraverso studi clinici. Per un'iniezione  
direttamente nell'occhio o un'iniezione intravitreale, una dose  
terapeuticamente efficace può essere dell'ordine da  $10^{11}$  a  $10^{12}$  o  
da  $10^{12}$  a  $10^{13}$  genomi vettoriali di 7m8-ranibizumab o di qualsiasi  
20 altra terapia genica anti-VEGF. In alcuni casi, la dose unitaria  
o una quantità terapeuticamente efficace di 7m8-ranibizumab o di  
qualsiasi altra terapia genica anti-VEGF è tra  $10^{10}$  e  $10^{11}$ , tra  
 $10^{11}$  e  $10^{12}$ , tra  $10^{10}$  e  $10^{12}$ , tra  $10^{12}$  e  $10^{13}$ , tra  $10^{11}$  e  $10^{13}$ , tra  
 $10^{12}$  e  $10^{13}$ , tra  $10^{12}$  e  $10^{14}$ , tra  $10^{11}$  e  $10^{14}$ , tra  $10^{11}$  e  $10^{15}$ , tra  
25  $10^{12}$  e  $10^{15}$ , tra  $10^{13}$  e  $10^{14}$ , tra  $10^{14}$  e  $10^{15}$ , tra  $10^{15}$  e  $10^{16}$ , tra

10<sup>16</sup> e 10<sup>17</sup>, tra 10<sup>17</sup> e 10<sup>18</sup>, tra 10<sup>18</sup> e 10<sup>19</sup>, o tra 10<sup>19</sup> e 10<sup>20</sup> genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria della composizione farmaceutica comprendente 7m8-ranibizumab o qualsiasi altra terapia genica anti-VEGF della descrizione è tra 1×10<sup>10</sup> e 2×10<sup>10</sup>,  
5 tra 2×10<sup>10</sup> e 3×10<sup>10</sup>, tra 3×10<sup>10</sup> e 4×10<sup>10</sup>, tra 4×10<sup>10</sup> e 5×10<sup>10</sup>, tra 5×10<sup>10</sup> e 6×10<sup>10</sup>, tra 6×10<sup>10</sup> e 7×10<sup>10</sup>, tra 7×10<sup>10</sup> e 8×10<sup>10</sup>, tra 8×10<sup>10</sup> e 9×10<sup>10</sup>, tra 9×10<sup>10</sup> e 10×10<sup>10</sup>, tra 1×10<sup>11</sup> e 2×10<sup>11</sup>, tra 2×10<sup>11</sup> e 3×10<sup>11</sup>, tra 2×10<sup>11</sup> e 2,5×10<sup>11</sup>, tra 2,5×10<sup>11</sup> e 3×10<sup>11</sup>, tra 3×10<sup>11</sup> e 4×10<sup>11</sup>, tra 4×10<sup>11</sup> e 5×10<sup>11</sup>, tra 5×10<sup>11</sup> e 6×10<sup>11</sup>, tra 6×10<sup>11</sup> e 7×10<sup>11</sup>,  
10 tra 7×10<sup>11</sup> e 8×10<sup>11</sup>, tra 8×10<sup>11</sup> e 9×10<sup>11</sup>, tra 9×10<sup>11</sup> e 10×10<sup>11</sup>, tra 1×10<sup>12</sup> e 2×10<sup>12</sup>, tra 2×10<sup>12</sup> e 3×10<sup>12</sup>, tra 2,5×10<sup>12</sup> e 3×10<sup>12</sup>, tra 3×10<sup>12</sup> e 4×10<sup>12</sup>, tra 4×10<sup>12</sup> e 5×10<sup>12</sup>, tra 5×10<sup>12</sup> e 6×10<sup>12</sup>, tra 6×10<sup>12</sup> e 7×10<sup>12</sup>, tra 7×10<sup>12</sup> e 8×10<sup>12</sup>, tra 8×10<sup>12</sup> e 9×10<sup>12</sup>, tra 9×10<sup>12</sup> e 10×10<sup>12</sup>, tra 1×10<sup>13</sup> e 2×10<sup>13</sup>, tra 2×10<sup>13</sup> e 3×10<sup>13</sup>, tra 3×10<sup>13</sup> e 4×10<sup>13</sup>,  
15 tra 4×10<sup>13</sup> e 5×10<sup>13</sup>, tra 5×10<sup>13</sup> e 6×10<sup>13</sup>, tra 6×10<sup>13</sup> e 7×10<sup>13</sup>, tra 7×10<sup>13</sup> e 8×10<sup>13</sup>, tra 8×10<sup>13</sup> e 9×10<sup>13</sup>, o tra 9×10<sup>13</sup> e 10×10<sup>13</sup> genomi vettoriali. In alcuni casi, la dose unitaria di 7m8-ranibizumab o di qualsiasi altra terapia genica anti-VEGF di questa descrizione è tra 2,1×10<sup>11</sup> o tra 2,1×10<sup>12</sup> genomi vettoriali. In  
20 alcuni casi, la dose unitaria di rAAV di questa descrizione è tra 10<sup>10</sup> e 10<sup>13</sup>, tra 10<sup>10</sup> e 10<sup>11</sup>, tra 10<sup>11</sup> e 10<sup>12</sup>, tra 10<sup>12</sup> e 10<sup>13</sup>, o tra 10<sup>13</sup> e 10<sup>14</sup> genomi vettoriali.

**[0194]** In alcuni casi, la dose unitaria di 7m8-ranibizumab o di qualsiasi altra terapia genica anti-VEGF di questa descrizione è  
25 tra 1×10<sup>10</sup> e 2×10<sup>10</sup>, tra 2×10<sup>10</sup> e 4×10<sup>10</sup>, tra 3×10<sup>10</sup> e 5×10<sup>10</sup>, tra

4x10<sup>10</sup> e 6x10<sup>10</sup>, tra 5x10<sup>10</sup> e 7x10<sup>10</sup>, tra 6x10<sup>10</sup> e 8x10<sup>10</sup>, tra 7x10<sup>10</sup>  
e 9x10<sup>10</sup>, tra 8x10<sup>10</sup> e 10<sup>11</sup>, tra 1x10<sup>11</sup> e 2x10<sup>11</sup>, tra 2x10<sup>11</sup> e 4x10<sup>11</sup>,  
tra 3x10<sup>11</sup> e 5x10<sup>11</sup>, tra 4x10<sup>11</sup> e 6x10<sup>11</sup>, tra 5x10<sup>11</sup> e 7x10<sup>11</sup>, tra  
6x10<sup>11</sup> e 8x10<sup>11</sup>, tra 7x10<sup>11</sup> e 9x10<sup>11</sup>, tra 8x10<sup>11</sup> e 10x10<sup>11</sup>, tra 1x10<sup>12</sup>  
5 e 3x10<sup>12</sup>, tra 2x10<sup>12</sup> e 4x10<sup>12</sup>, tra 3x10<sup>12</sup> e 5x10<sup>12</sup>, tra 4x10<sup>12</sup> e  
6x10<sup>12</sup>, tra 5x10<sup>12</sup> e 7x10<sup>12</sup>, tra 6x10<sup>12</sup> e 8x10<sup>12</sup>, tra 7x10<sup>12</sup> e 9x10<sup>12</sup>,  
tra 8x10<sup>12</sup> e 10x10<sup>12</sup>, tra 1x10<sup>13</sup> e 5x10<sup>13</sup>, tra 5x10<sup>13</sup> e 10x10<sup>13</sup>, tra  
10<sup>12</sup> e 5x10<sup>12</sup>, tra 5x10<sup>12</sup> e 1x10<sup>13</sup>, tra 7x10<sup>12</sup> e 1x10<sup>13</sup>, tra 8x10<sup>12</sup> e  
2x10<sup>13</sup>, tra 9x10<sup>12</sup> e 2x10<sup>13</sup>, tra 9x10<sup>12</sup> e 2x10<sup>13</sup>, tra 9x10<sup>12</sup> e 4x10<sup>13</sup>,  
10 tra 1x10<sup>13</sup> e 3x10<sup>10</sup>, tra 1x10<sup>13</sup> e 2x10<sup>13</sup>, tra 2x10<sup>13</sup> e 3x10<sup>13</sup>, tra  
3x10<sup>13</sup> e 4x10<sup>13</sup>, tra 4x10<sup>13</sup> e 5x10<sup>13</sup>, tra 5x10<sup>13</sup> e 6x10<sup>13</sup>, tra 6x10<sup>13</sup>  
e 7x10<sup>13</sup>, tra 7x10<sup>13</sup> e 8x10<sup>13</sup>, tra 8x10<sup>13</sup> e 9x10<sup>10</sup>, o tra 8x10<sup>13</sup> e  
1x10<sup>14</sup> genomi vettoriali.

**[0195]** In alcuni casi, la quantità totale di 7m8-ranibizumab o  
15 di qualsiasi altra terapia genica anti-VEGF iniettata in un  
paziente o un soggetto umano entro un periodo da 5 a 10 anni non  
è superiore da 10<sup>10</sup> a 10<sup>13</sup>, da 10<sup>10</sup> a 10<sup>11</sup>, da 10<sup>11</sup> a 10<sup>12</sup>, da 10<sup>12</sup> a  
10<sup>13</sup>, o da 10<sup>13</sup> a 10<sup>14</sup> genomi vettoriali, o non è superiore da  
1x10<sup>10</sup> a 2x10<sup>10</sup>, da 2x10<sup>10</sup> a 4x10<sup>10</sup>, da 3x10<sup>10</sup> a 5x10<sup>10</sup>, da 4x10<sup>10</sup> a  
20 6x10<sup>10</sup>, da 5x10<sup>10</sup> a 7x 10<sup>10</sup>, da 6x10<sup>10</sup> a 8x10<sup>10</sup>, da 7x10<sup>10</sup> a 9x10<sup>10</sup>,  
da 8x10<sup>10</sup> a 10<sup>11</sup>, da 1x10<sup>11</sup> a 2x10<sup>11</sup>, da 2x10<sup>11</sup> a 4x10<sup>11</sup>, da 3x10<sup>11</sup> a  
5x10<sup>11</sup>, da 4x10<sup>11</sup> a 6x10<sup>11</sup>, da 5x10<sup>11</sup> a 7x10<sup>11</sup>, da 6x10<sup>11</sup> a 8x10<sup>11</sup>,  
da 7x10<sup>11</sup> a 9x10<sup>11</sup>, da 8x10<sup>11</sup> a 10x10<sup>11</sup>, da 1x10<sup>12</sup> a 3x10<sup>12</sup>, da 2x10<sup>12</sup>  
a 4x10<sup>12</sup>, da 3x10<sup>12</sup> a 5x10<sup>12</sup>, da 4x10<sup>12</sup> a 6x10<sup>12</sup>, da 5x10<sup>12</sup> a 7x10<sup>12</sup>,  
25 da 6x10<sup>12</sup> a 8x10<sup>12</sup>, da 7x10<sup>12</sup> a 9x10<sup>12</sup>, da 8x10<sup>12</sup> a 10x10<sup>12</sup>, da 1x10<sup>13</sup>

a  $5 \times 10^{13}$ , da  $5 \times 10^{13}$  a  $10 \times 10^{13}$ , da  $10^{12}$  a  $5 \times 10^{12}$ , da  $5 \times 10^{12}$  a  $1 \times 10^{13}$ , da  $7 \times 10^{12}$  a  $1 \times 10^{13}$ , da  $8 \times 10^{12}$  a  $2 \times 10^{13}$ , da  $9 \times 10^{12}$  a  $2 \times 10^{13}$ , da  $9 \times 10^{12}$  a  $2 \times 10^{13}$ , da  $9 \times 10^{12}$  a  $4 \times 10^{13}$ , da  $1 \times 10^{13}$  a  $3 \times 10^{13}$ , da  $1 \times 10^{13}$  a  $2 \times 10^{13}$ , da  $2 \times 10^{13}$  a  $3 \times 10^{13}$ , da  $3 \times 10^{13}$  a  $4 \times 10^{13}$ , da  $4 \times 10^{13}$  a  $5 \times 10^{13}$ , da  $5 \times 10^{13}$  a  $6 \times 10^{13}$ , da  $6 \times 10^{13}$  a  $7 \times 10^{13}$ , da  $7 \times 10^{13}$  a  $8 \times 10^{13}$ , da  $8 \times 10^{13}$  a  $9 \times 10^{10}$ , o da  $8 \times 10^{13}$  a  $1 \times 10^{14}$  genomi vettoriali.

**[0196]** In alcuni casi, la quantità terapeuticamente efficace di composizioni farmaceutiche descritte qui comprende i genomi vettoriali da  $2E12$  a  $6E12$ . In alcuni casi, una dose unitaria comprende circa  $1E12$ ,  $1,5E12$ ,  $2E12$ ,  $2,5E12$ ,  $3E12$ ,  $3,5E12$ ,  $4E12$ ,  $4,5E12$ ,  $5E12$ ,  $5,5E12$ ,  $6E12$ ,  $6,5E12$ ,  $7E12$ ,  $7,5E12$ ,  $8E12$ ,  $8,5E12$ ,  $9E12$ , o  $9,5E12$  genomi vettoriali. In alcuni casi, una dose unitaria comprende tra  $1E12$  e  $1,5E12$ , tra  $1,5E12$  e  $2E12$ , tra  $2E12$  e  $2,5E12$ , tra  $2,5E12$  e  $3,0E12$ , tra  $3,0E12$  e  $3,5E12$ , tra  $3,5E12$  e  $4,0E12$ , tra  $4,0E12$  e  $4,5E12$ , tra  $4,5E12$  e  $5,0E12$ , tra  $5,0E12$  e  $5,5E12$ , tra  $5,5E12$  e  $6,0E12$ , tra  $6,0E12$  e  $6,5E12$ , tra  $6,5E12$  e  $7,0E12$ , tra  $7,0E12$  e  $7,5E12$ , tra  $7,5E12$  e  $8,0E12$ , tra  $8,0E12$  e  $8,5E12$ , tra  $8,5E12$  e  $9,0E12$ , tra  $9,0E12$  e  $9,5E12$ , o tra  $9,5E12$  e  $10E12$  genomi vettoriali. In alcuni casi, una dose unitaria comprende almeno  $1E12$ ,  $1,5E12$ ,  $2E12$ ,  $2,5E12$ ,  $3E12$ ,  $3,5E12$ ,  $4E12$ ,  $4,5E12$ ,  $5E12$ ,  $5,5E12$ ,  $6E12$ ,  $6,5E12$ ,  $7E12$ ,  $7,5E12$ ,  $8E12$ ,  $8,5E12$ ,  $9E12$ , o  $9,5E12$  genomi vettoriali. In alcuni casi, una dose unitaria comprende non più di  $1E12$ ,  $1,5E12$ ,  $2E12$ ,  $2,5E12$ ,  $3E12$ ,  $3,5E12$ ,  $4E12$ ,  $4,5E12$ ,  $5E12$ ,  $5,5E12$ ,  $6E12$ ,  $6,5E12$ ,  $7E12$ ,  $7,5E12$ ,  $8E12$ ,  $8,5E12$ ,  $9E12$ ,  $9,5E12$ , o  $10E12$  genomi vettoriali.

[0197] In alcuni casi, viene utilizzata una concentrazione inferiore (per esempio di genomi vettoriali) per una dose unitaria per prevenire l'aggregazione, che può avvenire a concentrazioni superiori. In alcuni casi, viene scelta una  
5 concentrazione superiore, per esempio, superiore di genomi vettoriali, per una dose unitaria per incrementare l'efficacia della terapia genica, o per massimizzare il rilascio del transgene anti-VEGF in un'iniezione o in una somministrazione singola della terapia genica. In alcuni casi, concentrazioni  
10 superiori delle composizioni farmaceutiche descritte qui permettono volumi più piccoli di iniezione, il che può ridurre gli effetti avversi associati a un'iniezione intravitreale, per esempio, pressione intraoculare elevata, infiammazione, irritazione, o dolore.

15 [0198] In alcuni casi, 7m8-ranibizumab o qualsiasi altra terapia genica anti-VEGF o una loro composizione farmaceutica può essere somministrata come dose singola o dose unica. In alcuni casi, si possono impiegare più di una somministrazione per raggiungere il livello desiderato di espressione genica nel corso di un periodo  
20 prolungato di vari intervalli, per esempio, non più di una volta in almeno 2 anni, o in almeno 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o più anni. In alcuni casi, l'iniezione intravitreale di 7m8-ranibizumab o di qualsiasi altra terapia genica anti-VEGF fa evitare al paziente il bisogno di ricevere un'iniezione proteica  
25 approvata per almeno 1 anno o per 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,

20, 30 o più anni.

#### **ESEMPI**

##### **Esempio 1: Valutazione dell'efficacia di 7m8-sVEGFR-1 in scimmie**

- 5 **[0199]** Obiettivo: Per valutare l'efficacia di 7m8-sFLT-1 in seguito alla somministrazione intravitreale (IVT) di  $2 \times 10^{12}$  vg nell'inibire lo sviluppo della neovascolarizzazione coroidea (CNV) indotta dalla fotocoagulazione laser in scimmie verdi africane. Un ulteriore obiettivo può essere quello di valutare l'espressione regionale di sFLT-1 nei tessuti oculari.
- 10 **[0200]** Il modello di lesione CNV in scimmie è un modello standard di primati generalmente accettato e ampiamente utilizzato per valutare la potenziale efficacia di terapie per il trattamento delle malattie dell'occhio associate alla neovascolarizzazione, quale la DMLE umida.
- 15 **[0201]** Reclutamento di soggetti: le scimmie sono state sottoposte ad analisi di base per verificare la salute oculare e generale mediante tonometria, biomicroscopia con lampada a fessura, esame del fondo oculare, fotografia a colori del fondo oculare (CFP), angiografia a fluorescenza (FA) e tomografia a  
20 coerenza ottica (OCT). Trentanove animali con risultati normali sono stati arruolati nello studio e randomizzati in quattro gruppi di trattamento in base al loro peso corporeo e sesso (**tabella 1**). È stato applicato un unguento oftalmico di atropina all'1% in seguito agli esami di base.

**Tabella 1: Assegnazione del trattamento**

Gruppo	N	Trattamento OU	Via	Dose (µl)	Laser OU	Lampada a fessura e CFP	FA e OCT	Termine e raccolta dei tessuti
1	6	AAV2,7m8-sVEGFR-1	IVT; Giorno 0	1x100 µl	Giorno 56	Linea di base, giorni 0 (dopo	Linea di base, post-vescicola, giorni 70 e 84	Giorno 85
2	6	Veicolo	IVT; Giorno 0	1x100 µl	Giorno 56	l'iniezione), 7, 14, 56 e 84	giorni 70 e 84	

\* La CFP sarà inoltre eseguita il giorno 21 se le immagini del giorno 14 non rivelano immagini chiare di vescicole stabilizzate. La lampada a fessura è stata eseguita prima del laser al giorno 56 ma non immediatamente dopo l'iniezione al giorno 0.

[0202] Al giorno 0 dello studio i gruppi 1-2 delle scimmie hanno ricevuto IVT AAV2,7m8-sFLT-1 o il veicolo OU secondo il programma di trattamento (**Tabella 1**). Prima del dosaggio di IVT, è stata somministrata un'anestesia locale topica (proparacaina allo 0,5%) e gli occhi sono stati disinfettati con Betadine al 5% e risciacquati con una soluzione salina sterile normale. Le iniezioni di IVT possono essere somministrate utilizzando un ago da 31 gauge, di 0,5 pollici posto 2 mm posteriormente al limbo del quadrante temporale inferiore, mirando il vitreo centrale.

10 [0203] Tutte le iniezioni di IVT possono essere seguite dalla

somministrazione topica di ciprofloxacina allo 0,3%, o di una soluzione oftalmica antibiotica equivalente, e di un unguento di atropina solfato all'1%.

5 **[0204]** Il giorno 56, la CNV è stata indotta tra le arcate temporali vascolari con fasci di laser. Nove macchie da laser sono state poste simmetricamente in ciascun occhio da un oftalmologo impiegando un laser Iridex Oculight Texas a 532 nm con una durata del laser di 100 ms, dimensione delle macchie 50 µm, potenza a 750 mW. Le macchie da laser sono state applicate  
10 utilizzando una lente da 0,9× di laser a contatto. La posizione bersaglio delle macchie da laser è stata mappata da un oftalmologo esperto sulle immagini a colori del fondo oculare ottenute prima del trattamento con il laser (e successivamente al posizionamento delle vescicole) come riferimento durante il  
15 posizionamento delle macchie da laser. La fotografia a colori del fondo oculare è stata eseguita immediatamente dopo il trattamento con il laser per documentare le lesioni da laser. Qualsiasi macchia che dimostrava una grave emorragia retinica/subretinale immediatamente dopo il laser veniva esclusa  
20 dalle analisi. La **figura 1** illustra una tipica fotografia del fondo oculare di un occhio di un primate diverso dall'uomo dopo l'induzione di lesioni CNV mediante irradiazione con laser.

**[0205]** Le immagini bilaterali a colori del fondo oculare della retina sono state catturate con 50 gradi di vista centrata sulla  
25 fovea utilizzando una camera retinica Topcon TRC-50EX con un

hardware di Canon 6D di visualizzazione digitale delle immagini e il New Vision Fundus Image Analysis System software. L'FA è stata eseguita con la somministrazione endovenosa di 0,1 ml/kg di fluoresceina sodica al 10%. La perdita di fluoresceina negli angiogrammi delle lesioni CNV è stata classificata (I-IV; **Tabella 2**) da un oftalmologo mascherato che valutava i compositi generati dopo una regolazione uniforme dell'intensità dell'immagine. La determinazione della classificazione delle lesioni è stata confermata sulle immagini del fondo oculare da altri due oftalmologi esperti. L'analisi della densitometria di fluorescenza delle immagini degli angiogrammi grezzi di uno stadio avanzato può essere eseguita utilizzando anche il programma ImageJ.

**Tabella 2: Scala di valutazione di lesioni da laser**

<b>Grado di lesione</b>	<b>Definizione</b>
I	No iperfluorescenza - confrontare il pre-FA con 30 sec di post-FA. Cercare l'assenza di iperfluorescenza nella lesione
II	Iperfluorescenza senza perdita - confrontare 30 sec di FA con 3 e 6 min di FA. Cercare l'iperfluorescenza senza una significativa colorazione residua in 6 min di FA.
III	Perdita di iperfluorescenza all'inizio o a metà del transito e alla fine - confrontare 30 sec di FA con 3 e 6

**Tabella 2: Scala di valutazione di lesioni da laser**

Grado di lesione	Definizione
	min di FA. Cercare una colorazione residua significativa nella lesione a 6 min di FA.
IV	Perdita di iperfluorescenza all'inizio o a metà del transito e alla fine che si estende oltre ai margini dell'area trattata - confrontare 30 sec di FA con 3 e 6 min di FA. Cercare una colorazione consistente oltre al bordo della lesione come visto in 30 sec di FA.

[0206] I soggetti venivano valutati due volte al giorno per il loro benessere generale. Osservazioni dettagliate venivano eseguite una volta alla settimana. I pesi corporei sono stati ottenuti al momento delle analisi di base e ogni due settimane durante lo studio con gli animali in vita.

[0207] Tutti gli animali sono stati sacrificati con pentobarbital dopo aver confermato la qualità della visualizzazione delle immagini del fondo oculare il giorno 85, o poco dopo, in attesa della revisione delle immagini. Gli animali sono stati quindi sacrificati con pentobarbital e i globi sono stati enucleati. Il tessuto orbitale in eccesso è stato tagliato ed entrambi i globi OD e OS sono stati congelati all'istante in azoto liquido quindi sezionati lungo i piani del tessuto congelato a temperatura ambiente per isolare il vitreo e la

*Filippo Montebelli*

retina con i tessuti sottostanti coroidei. Dopo il prelievo del vitreo, sono stati prelevati punzoni da 5 mm di retina neurale con RPE/coroide dalla macula e dalle regioni temporali e nasali superiori e inferiori. Quando lo spazio lo permetteva, venivano  
5 prelevati ulteriori punzoni periferici. La retina con i tessuti sottostanti RPE/coroidei da ogni punzone è stata trasferita in crioprovette pretarate etichettate, è stata pesata e sottoposta a congelamento all'istante in azoto liquido. Prima e dopo il prelievo delle biopsie mediante bisturi circolare, è stata presa  
10 una fotografia della retina piatta sezionata con indicazioni dell'orientamento per documentare le regioni dalle quali sono stati raccolti i punzoni.

[0208] Metodi statistici: Un test esatto di Fisher è stato utilizzato per valutare l'incidenza dei diversi gradi di lesione.  
15 È stato utilizzato un ANOVA a due vie con misure ripetute cui segue la prova di Tukey-Kramer o una procedura con contrasto per analizzare l'area del complesso OCT CNV e i dati di densitometria dell'immagine dell'angiogramma. I test non parametrici venivano applicati quando i dati non erano normalmente distribuiti e  
20 avevano una varianza disuguale. Il valore di P di 0,05 o inferiore è stato considerato statisticamente significativo.

[0209] La **figura** 3 illustra un grafico della percentuale di lesioni di grado IV nei giorni 14 e 28 degli animali dei gruppi 3 e 4, iniettati intravitrealmente con AAV2,7m8-sVEGFR-1 o un  
25 veicolo di controllo comprendente solo il tampone di

formulazione. Le lesioni CNV sono state indotte mediante irradiazione con laser immediatamente dopo l'iniezione in ciascun gruppo dei soggetti in esame, e la fotografia a colori del fondo oculare è stata utilizzata per classificare ciascuna lesione su una scala di I-IV. Le scimmie trattate con AAV2,7m8-sVEGFR-1 hanno mostrato una leggera diminuzione della quantità di lesioni di grado IV rispetto alla somministrazione del veicolo da solo nelle immagini del fondo oculare raccolte il giorno 14, quando somministrato intravitrealmente. Le scimmie trattate intravitrealmente con AAV2,7m8-sFLT-1 non hanno mostrato alcuna riduzione significativa nella quantità di lesioni di grado IV in confronto alla somministrazione del veicolo da solo al giorno 28.

**Esempio 2: Valutazione dell'efficacia di 7m8-ranibizumab in scimmie**

[0210] Studi simili in vivo come descritti nell'esempio 1 sono stati eseguiti in scimmie utilizzando lo stesso protocollo e l'AAV2,7m8-ranibizumab, che è un rAAV2 comprendente la sequenza 7m8 inserita tra le posizioni 587 e 588 della proteina del capsido VP1 dell'AAV2 e una sequenza nucleotidica che codifica ranibizumab.

[0211] Come illustrato in **figura 4**, l'AAV2,7m8-ranibizumab somministrato intravitrealmente ha impedito la comparsa di lesioni di grado IV di CNV indotte da laser. Sono stati somministrati l'AAV2,7m8-ranibizumab, il ranibizumab da solo

(controllo positivo), o il veicolo di controllo comprendente un tampone di formulazione agli occhi di primati diversi dall'uomo mediante iniezione intravitreale a una dose di  $2 \times 10^{12}$  vg. Le lesioni CNV sono state quindi indotte dall'irradiazione con laser in tutti i gruppi, ed è stata utilizzata la fotografia a colori del fondo oculare per classificare ciascuna lesione su una scala di I-IV. Le misurazioni della percentuale delle lesioni di grado IV sono state quindi mediate e disegnate. L'AAV2,7m8-ranibizumab ha significativamente ridotto le lesioni CNV in vivo a livelli paragonabili al ranibizumab da solo al giorno 14 (barra di grigio chiaro) e al giorno 28 (barra di grigio scuro).

**[0212]** Questi studi in vivo in scimmie hanno suggerito che l'AAV2,7m8-ranibizumab può essere una valida opzione di terapia genica per l'uomo.

15

## RIVENDICAZIONI

1. Composizione farmaceutica comprendente:

(a) una variante di rAAV2 comprendente una sequenza amminoacidica LGETTRP inserita tra le posizioni 587 e 588 della proteina del capsid VP1, un acido nucleico codificante: (i) una sequenza  
5  
avente almeno il 95% di identità alla SEQ ID NO: 9; e (ii) una sequenza avente almeno il 95% di identità alla SEQ ID NO: 10, e  
(b) un eccipiente farmaceuticamente accettabile;

per l'uso nel metodo di trattamento di una malattia o una  
10  
condizione dell'occhio scelta tra: degenerazione maculare neovascolare (umida) legata all'età (DMLE), neovascolarizzazione coroidea, edema maculare secondario ad occlusione della vena retinica, edema maculare diabetico (DME), occlusione della vena retinica, e retinopatia diabetica associata a DME, il metodo  
15  
comprendente la somministrazione di una dose unitaria della composizione farmaceutica mediante iniezione intravitreale a un occhio di un soggetto primate che lo richiede.

2. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui la dose unitaria è tra  $1E8$  e  $3E14$  genomi vettoriali.

20  
3. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui la dose unitaria è tra  $1E9$  e  $3E13$  genomi vettoriali.

4. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui la dose unitaria è tra  $1E10$  e  $1E13$  genomi vettoriali.

5. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui la  
25  
dose unitaria è tra  $2E12$  e  $6E12$  genomi vettoriali.

6. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui il soggetto è l'uomo.
7. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui la condizione o la malattia  
5 oculare è la neovascolarizzazione coroidea o la DMLE umida.
8. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui la somministrazione della composizione porta a una riduzione in percentuale delle lesioni di grado IV di almeno il 5%, o di almeno il 10%, in confronto a  
10 un veicolo di controllo, come misurato dalla fotografia a colori del fondo oculare.
9. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la dose unitaria: (a) ha un volume che non è superiore a 100 µl; o (b) ha un volume che non  
15 è superiore a 50 µl.
10. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il soggetto è sensibile ad almeno uno tra ranibizumab, bevacizumab, e sVEGFR-1.
11. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle  
20 rivendicazioni precedenti, in cui il soggetto è stato sottoposto a un trattamento precedente con ranibizumab o bevacizumab.
12. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui: (a) la somministrazione mediante iniezione avviene non più di una volta in almeno 2 anni  
25 o non più di una volta in almeno 5 anni; o (b) la somministrazione

è un'unica somministrazione.

13. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la composizione farmaceutica è una sospensione.

5 14. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 13, comprendente inoltre: (a) agitare la sospensione per garantire una distribuzione omogenea prima del passaggio della somministrazione; e/o (b) riscaldare la sospensione a temperatura ambiente prima del passaggio della somministrazione.

10 15. Composizione per l'uso secondo la rivendicazione 13 o la rivendicazione 14, in cui la sospensione comprende inoltre: (a) un tensioattivo, in cui il tensioattivo viene facoltativamente scelto tra polisorbati, dodecilsolfato di sodio, laurilsolfato di sodio, ossido di laurildimetilammina, alcoli polietossilati, 15 poliossietilensorbitano, ottossinolo, Brij, pluronic, e olio di ricino poliossilico; e/o (b) fenolo, mannitolo, sorbitolo, o cloruro di sodio.

16. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente inoltre la 20 somministrazione di una soluzione antibiotica, per esempio una soluzione antibiotica comprendente ciprofloxacina, o di un unguento di atropina solfato dopo l'iniezione.

17. Composizione per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la variante di rAAV2 comprende 25 un acido nucleico codificante la sequenza della SEQ ID NO: 9 e

la sequenza della SEQ ID NO: 10.

LEGENDA DELLE TAVOLE DI DISEGNO

TAVOLA 1/4

FIGURA 1

"Fig. 1" = Figura 1

5 TAVOLA 2/4

FIGURA 2

"Fig. 2" = Figura 2

TAVOLA 3/4

FIGURA 3

10 "Fig. 3" = Figura 3

"% Grade IV CNV Lesions" = % di lesioni CNV di grado IV

"Vehicle" = Veicolo

"Day" = Giorno

"concurrent vehicle" = veicolo concomitante

15 TAVOLA 4/4

FIGURA 4

"Fig. 4" = Figura 4

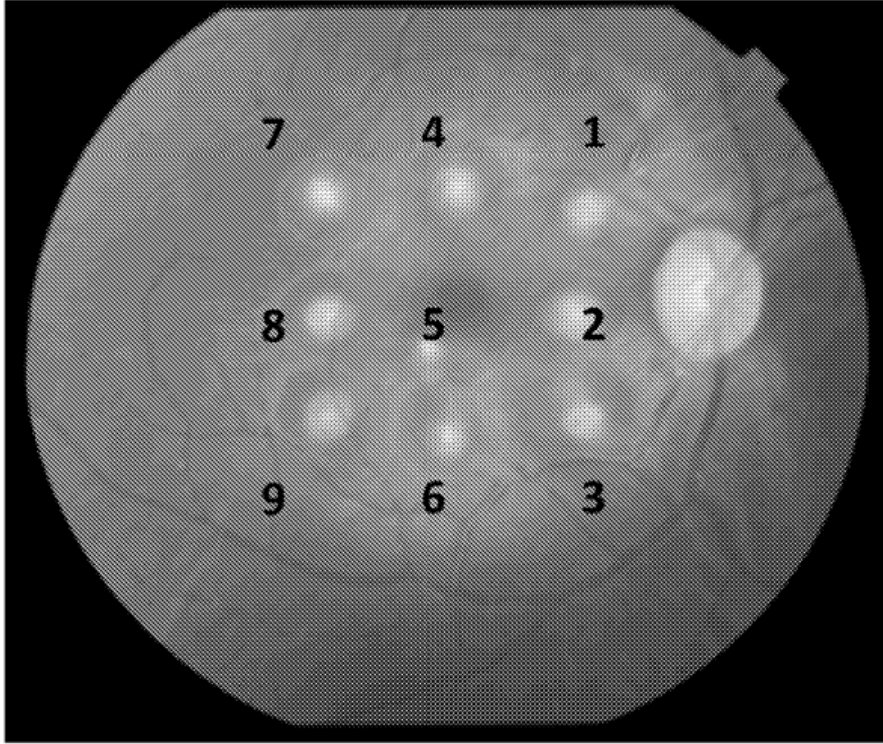
"% Grade IV CNV Lesions" = % di lesioni CNV di grado IV

"Day" = Giorno

20 "Vehicle" = Veicolo

"concurrent vehicle" = veicolo concomitante

**FIG. 1**



*Rolando Monteb*

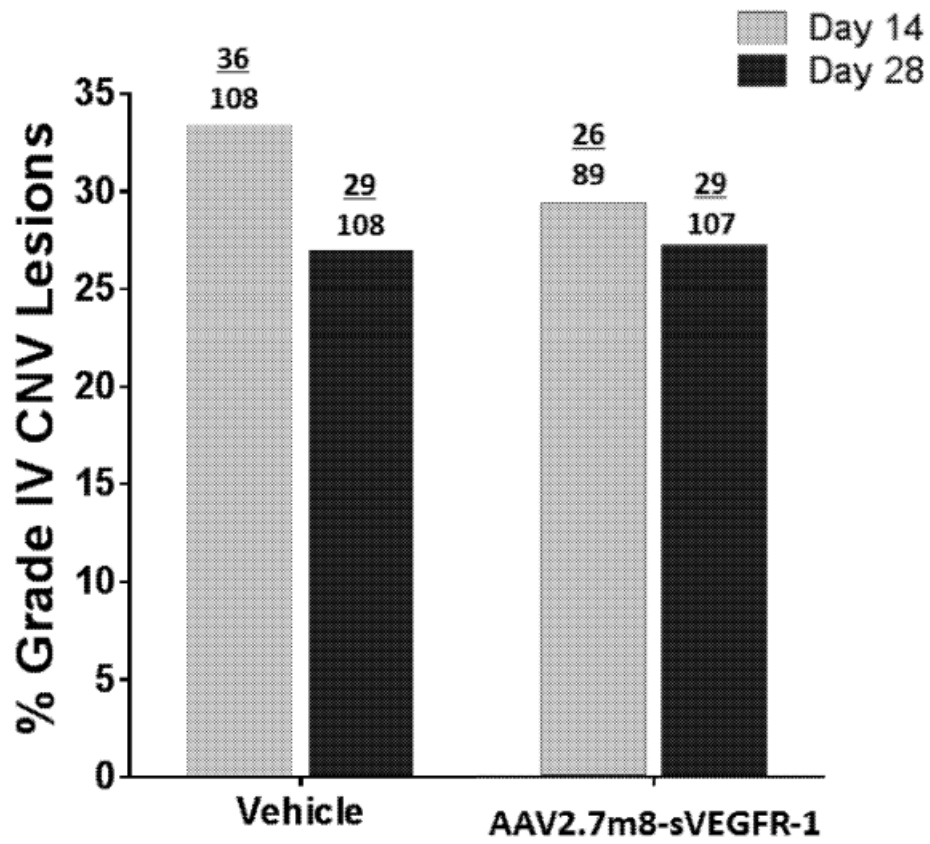
FIG. 2

sPLT-1

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGGTCCTGCTGTGCGCGGCTCAGCTGTCTGCTCTCACAGGATCTAGTTCAGGTTCAAAAATAAAAGAT  
 CCTGAAGTAAAGGACCCAGCACATCATGCAAGCGCCAGCAGCATCTCCAATCGAGGGGGAAGCCCATAAATGGTCT  
 TTGGCTGAAATGGTGAGTAGGAAAGCGAAGGCTGAGCATAACTAAATCTGCTGTGGAAGAAATGGCAACAATTTGCAGTACTTTAA  
 CCTTGAACACAGCTCAAGCAACCCACTGGCTTCTACAGCTGCAATATCTAGCTACTTCAAAGAAAGGAAACAGAAATCTGCAA  
 TCTATATTTTAGTGATACAGGTAGACCTTCGTAGAGATGTACAGTGAATCCCGAAATATACACATGACTGAAGGAAGGGAGCTCG  
 TCATCCCTGCGGGTTACGTACCTAACATCACTGTACTTTAAAAAAGTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGSAACCGCATAATCTGG  
 GACAGTAGAAAAGGCTTCATCATATCAATGCAACGTACAAAGAAATAGGCTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAA  
 GACAACTATCTCACACATCGAACCAATACAATCATAGATGTCCAAATAGCACACCACGCCAGTCAAAATTTACTTAGAGGCCATACTCTT  
 GTCCCAATTTGACTGCTACACTCCCTTGAACACGAGGTTCAAATGACTGGAGTTACCCCTGATGAAAAAATAAGAGAGCTTCCCGTAAAG  
 CGACGAATTGACCAAAGCAATCCCATGCCAACATATTTACAGTGTCTTACTATTGACAAAAATGCAGAACAAAGACAAAAGGACTTTATACTT  
 GTCGGTAAAGGAGTGGACCATCTCAATCTGTTAACACCTCAGTGCATATATGATAAAGCATTTCCTCGCCGGAAGTTGTATGTTAAAAAGATG  
 AAGTGTGAAACCGTAGCTGGCAAGCGGCTTACCAGGCTCTATGAAAGTGAAGGCAATTCCTCGCCGGAAGTTGTATGTTAAAAAGATG  
 GGTACTCGACTGAGAAAATCTGCTCGCTATTTGACTCGTGGCTAATCAAGGACGTAACTGAAGAGGATGCAGGGAAATTATA  
 CAATCTTGTGAGCATAAAACAGTCAAATGTGTTTAAAAACCTCACTGCCACTTAATGTCAATGTGAACCCAGATTTACGAAAAGGCCGT  
 GTCATCGTTCCAGACCCGGCTCTACCCACTGGGACGACAAATCTGACTTGTACCCGATATGGTATCCCTCAACCTACAATCAAGTGG  
 TTCTGGCACCCCTGTAAACCAATCAATCCGAAGCAAGGTGTGACTTTTGTCCAAATGAAAGAGTCTTTTATCCTGGATGCTGACAGCAACA  
 TGGGAAACAGAAATGAGAGCATCACTCAGCGCATGGCAATAATAGAAAGAAATAAGATGGCTAGCACCTTGGTTGGCTGACTTAGA  
 ATTTCTGGAATCTACATTTGCATAGCTTCCAATAAGTTGGACTGTGGGAAAGAAACATAAGCTTTTATACAGAGATGTCCTCAAAATGGGTTTC  
 ATGTTAACTTGGAAAAAATGCCGACGGAGGAGGACTGAAACTGTCTTGCACAGTTAAACAAGTTCTTATACAGAGACGTTACTTGGATTT  
 TACTGGGACAGTTAAACAGAACAAATGCACATACAGTATAGCAAGCAAAAAATGGCCATCACTAAGGAGCACCTCCACTCTTAACTTAC  
 CATCATGAATGTTCCCTGCAAGATTCAGGCACCTATGCCCTGCAAGCCAGGAAATGTATACAGGGGAAAGAAATCTCCAGAGAAAGAAA  
 TTACAATCAGAGGTGAGCACTGCAACAAAAAGGCTGTTTCTCCGGATCTCCAAATTTAAAGCACAAAGGAATGATTTGACCACACAAAAGTA  
 ATGTAACAAACATTA

*Polyo Monteb*

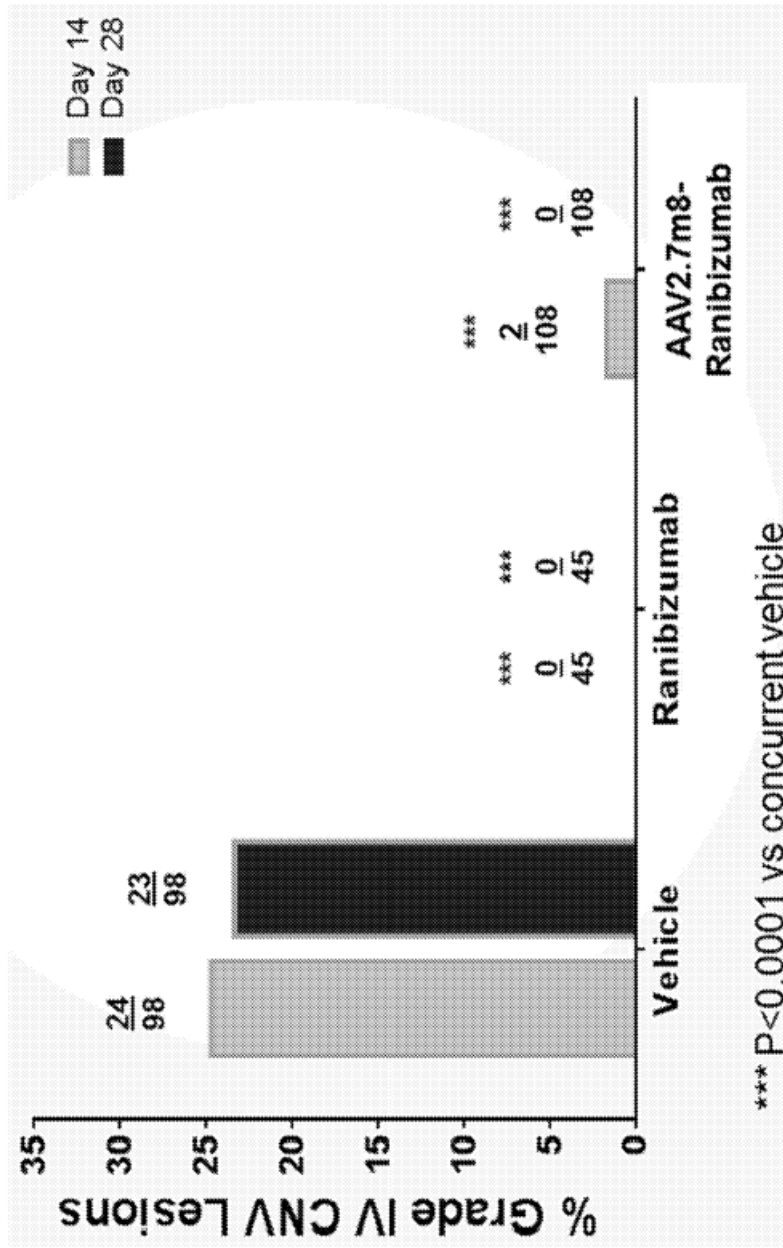
FIG. 3



\*\*\* P<0.0001 vs concurrent vehicle

*Prlygo Montel*

FIG. 4



*Polypio Montel*

Page 1 of 9  
SEQUENCE LISTING

<110> ADVERUM BIOTECHNOLOGIES, INC.  
<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR REDUCING OCULAR NEOVASCULARIZATION  
<130> 43016-719.601  
<140> PCT/US2017/038012  
<141> 2017-06-16  
<150> 62/351,231  
<151> 2016-06-16  
<160> 13  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide  
<400> 1  
Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro  
1 5  
  
<210> 2  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide  
<400> 2  
Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro  
1 5  
  
<210> 3  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide  
<400> 3  
Lys Ala Gly Gln Ala Asn Asn  
1 5  
  
<210> 4  
<211> 7  
<212> PRT

*Polyp Montel*

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 4

Lys Asp Pro Lys Thr Thr Asn  
1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 5

Lys Asp Thr Asp Thr Thr Arg  
1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 6

Arg Ala Gly Gly Ser Val Gly  
1 5

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 7

Ala Val Asp Thr Thr Lys Phe  
1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 8

*Polypo Montel*

Ser Thr Gly Lys Val Pro Asn  
1 5

<210> 9  
<211> 214  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

<400> 9  
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 231

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
polypeptide

&lt;400&gt; 10

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr  
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
180 185 190

*Polyo Montel*

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Leu  
 225 230

<210> 11  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 11  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

*Polypo Montel*

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 12  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 12  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe  
 50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly  
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly  
 130 135 140

*Polype Montel*

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val  
 145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe  
 165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val  
 195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys  
 210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu  
 225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser  
 290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala  
 325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 370 375 380

val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 385 390 395 400

*Polys Montech*

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
 405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys  
 450

<210> 13  
 <211> 2064  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 13  
 atggtcagct actgggacac cggggtcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc 60  
 acaggatcta gttcaggttc aaaattaaaa gatcctgaac tgagtttaaa aggcaccagc 120  
 cacatcatgc aagcaggcca gacactgcat ctccaatgca ggggggaagc agcccataaa 180  
 tggctcttgc ctgaaatggt gagtaaggaa agcgaagagc tgagcataac taaatctgcc 240  
 tgtggaagaa atggcaaaca attctgcagt actttaacct tgaacacagc tcaagcaaac 300  
 cacactggct tctacagctg caaatatcta gctgtaccta cttcaaagaa gaaggaaaca 360  
 gaatctgcaa tctatatatt tattagtgat acaggtagac ctttcgtaga gatgtacagt 420  
 gaaatccccg aaattatata catgactgaa ggaagggagc tcgtcattcc ctgcccgggt 480  
 acgtcaccta acatcactgt tactttaaaa aagtttccac ttgacacttt gatccctgat 540  
 ggaaaacgca taatctggga cagtagaaag ggcttcatca tatcaaatgc aacgtacaaa 600  
 gaaatagggc ttctgacctg tgaagcaaca gtcaatgggc atttgtataa gacaaactat 660  
 ctcacacatc gacaaaacaa tacaatcata gatgtccaaa taagcacacc acgccagtc 720  
 aaattactta gaggccatac tcttgtcctc aattgtactg ctaccactcc cttgaacagc 780  
 agagttcaaa tgacctggag ttaccctgat gaaaaaata agagagcttc cgtaaggcga 840  
 cgaattgacc aaagcaatc ccatgccaac atattctaca gtgttcttac tattgacaaa 900  
 atgcagaaca aagacaaagg actttatact tgtcgtgtaa ggagtggacc atcattcaaa 960  
 tctgttaaca cctcagtgca tatatatgat aaagcattca tcaactgtgaa acatcgaaaa 1020  
 cagcaggtgc ttgaaaccgt agctggcaag cggctctacc ggctctctat gaaagtgaag 1080  
 gcatttcctc cgcoggaagt tgtatggta aaagatgggt tacctgcgac tgagaaatct 1140  
 gctcgtatct tgaactcgtgg ctactcgtta attatcaagg acgtaactga agaggatgca 1200

*Allyo Montch*

gggaattata caatcttgct gagcataaaa cagtcaaagtg tgtttaaaaa cctcactgcc	1260
actctaattg tcaatgtgaa accccagatt tacgaaaagg cagtgtcatc gttccagac	1320
ccggtctctc acccactggg cagcagacaa atcctgactt gtaccgcata tggatccct	1380
caacctacaa tcaagtgggt ctggcaccoc tgtaaccata atcattccga agcaaggtgt	1440
gacttttgtt ccaataatga agagtccttt atcctggatg ctgacagcaa catgggaaac	1500
agaattgaga gcatcactca gcgcatggca ataatagaag gaaagaataa gatggctagc	1560
accttgggtg tggctgactc tagaatttct ggaatctaca tttgcatagc ttccaataaa	1620
gttgggactg tgggaagaaa cataagcttt tatatcacag atgtgcaaaa tgggtttcat	1680
gttaacttgg aaaaaatgcc gacggaagga gaggacctga aactgtcttg cacagttaac	1740
aagttcttat acagagacgt tacttggatt ttactgcgga cagttaataa cagaacaatg	1800
cactacagta ttagcaagca aaaaatggcc atcactaagg agcactccat cactcttaat	1860
cttaccatca tgaatgttcc cctgcaagat tcaggcacct atgctgcag agccaggaat	1920
gtatacacag ggaagaaat cctccagaag aaagaaatta caatcagagg tgagcactgc	1980
aacaaaaagg ctgttttctc tcggatctcc aaatttaaaa gcacaaggaa tgattgtacc	2040
acacaaagta atgtaaaaca ttaa	2064

[ "Page 1 of 9" = Pagina 1 di 9

"Sequence listing" = Elenco delle sequenze

"Compositions and methods for reducing ocular neovascularization" = Composizioni e metodi per ridurre la neovascolarizzazione oculare

"PatentIn version 3.5" = PatentIn versione 3.5

"Artificial sequence" = Sequenza artificiale

"Description of artificial sequence: synthetic peptide" = Descrizione della sequenza artificiale: peptide sintetico

"Page 2 of 9" = Pagina 2 di 9

"Page 3 of 9" = Pagina 3 di 9

"Description of artificial sequence: synthetic polypeptide" = Descrizione della sequenza artificiale: polipeptide sintetico

"Page 4 of 9" = Pagina 4 di 9

"Page 5 of 9" = Pagina 5 di 9

"Page 6 of 9" = Pagina 6 di 9

"Page 7 of 9" = Pagina 7 di 9

"Page 8 of 9" = Pagina 8 di 9

"Page 9 of 9" = Pagina 9 di 9]