



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 921**

51 Int. Cl.:
C12N 15/87 (2006.01)
C12M 1/42 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06779741 .5**
96 Fecha de presentación : **18.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1871890**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2008**

54 Título: **Procedimiento y dispositivos para el suministro de un producto terapéutico a la esfera ocular de un paciente.**

30 Prioridad: **18.04.2005 EP 05290855**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.11.2011

73 Titular/es: **INSERM (Institut National de La Santé et de La Recherche Médicale)**
101, rue de Tolbiac
75654 Paris Cédex 13, FR

72 Inventor/es: **Behar-Cohen, Francine;**
Benezra, David;
Bigey, Pascal;
Bloquel, Carole y
Scherman, Daniel

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 367 921 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivos para el suministro de un producto terapéutico a la esfera ocular de un paciente.

5 La presente invención se refiere, en general, a unos procedimientos mejorados para el suministro de un agente biológicamente activo, en particular un ácido nucleico terapéutico o profiláctico, a la esfera ocular de un sujeto que comprende la administración de dicho agente en el/los tejido(s) o las células del cuerpo ciliar. Se expone asimismo la posibilidad de administración en el tejido muscular o las células extraoculares. La exposición expone asimismo los dispositivos, sus utilizaciones, particularmente en terapia génica, y los procedimientos para el tratamiento de patologías de la esfera ocular mediante la administración específica de un producto terapéutico en el/los tejido(s) o las células del cuerpo ciliar (y/o en el tejido muscular o las células extraoculares), permitiendo de este modo la transferencia del producto terapéutico en el/los tejido(s) ocular(es) que se van a tratar. La exposición presenta asimismo composiciones farmacéuticas que comprenden el producto en una forma adecuada para la administración en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el tejido muscular o las células extraoculares, y presenta su preparación y sus utilizaciones.

Antecedentes de la invención

ANATOMÍA DEL OJO

20 El ojo es uno de los órganos más complejos del cuerpo. Parte del ojo, desde el punto de vista del desarrollo, es una extensión del sistema nervioso central. El ojo está compuesto de varias partes y una visión óptima o saludable así como las enfermedades oculares dependen de cómo esas partes funcionan conjuntamente.

25 El ojo se puede dividir anatómica y funcionalmente en una cámara anterior pequeña y una cámara posterior grande. Ambas cámaras están separadas por el cristalino que es un cuerpo transparente y biconvexo. El cristalino está conectado por fibras al músculo ciliar que mediante contracción o relajación altera su forma y su poder de focalización. El músculo ciliar no es un músculo esquelético.

30 La cámara posterior está rellena con el cuerpo vítreo, un fluido transparente y viscoso o de estructura gelatinosa compuesto de una red de fibras de colágeno suspendidas en un líquido que contiene ácido hialurónico.

35 El globo ocular está constituido por tres capas. La capa más externa está constituida por dos partes: la esclerótica y, en la parte frontal, la córnea. Debajo de la esclerótica se encuentra la coroides. Finalmente, la capa más interna y más sensible a la luz se denomina retina.

La esclerótica es una lámina protectora también conocida como la parte blanca del ojo. Es una capa de 0,3-1 mm de grosor de fibras de colágeno que recubre aproximadamente 80% de la superficie del globo ocular.

40 En la parte frontal del ojo, la córnea transparente sobresale de la esclerótica formando la "ventana del ojo" en forma de cúpula. La córnea humana se compone de 5 partes, es decir, el epitelio, la membrana de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio. Estas capas son importantes para mantener la transparencia de la córnea mediante un balance de fluidos adecuado y para evitar la entrada de agentes dañinos en el ojo. Sólo dos de las 5 capas de la córnea, el epitelio y el estroma, son barreras importantes contra el paso de fármacos al ojo. El endotelio y las membranas de Bowman y de Descemet no presentan una gran influencia para el paso de fármacos al ojo.

45 El epitelio de la córnea consta por sí mismo de cinco a seis capas de células con un grosor total de 50-100 µm que forman una barrera lipofílica para los fármacos. Presenta una función protectora que evita la entrada de agentes dañinos en el ojo y es también un tejido secretor de fluido que ayuda al endotelio en el mantenimiento de la hidratación del estroma y, por lo tanto, la transparencia de la córnea. Las células del epitelio se regeneran rápidamente y presentan la capacidad de autoreemplazarse durante los 3 días posteriores a una lesión. El estroma, que representa el 90% del grosor de la córnea contiene un 75-80% de agua entremezclada con las fibras de colágeno y representa, por lo tanto, un compartimiento muy hidrófilo.

55 Debajo de la esclerótica se encuentra la coroides que contiene los nervios y los vasos sanguíneos que suministran sangre al ojo y que lo drenan. La coroides se agranda en la parte frontal del ojo para formar el cuerpo ciliar, que secreta un líquido acuoso denominado humor acuoso.

60 Unido al cuerpo ciliar se encuentra el iris, la parte de color del ojo, que rodea una parte central denominada pupila. La función principal del iris es la de controlar el tamaño de la pupila y por lo tanto la cantidad de luz que entre en el ojo. Esto se consigue, como se ha explicado anteriormente, mediante la contracción del músculo esfínter del iris y la constricción del músculo dilatador. La melanina pigmentada que proporciona al iris su color, ayuda en la absorción de luz fuerte o brillante.

65 La parte más interna del ojo que contiene las células fotosensibles se denomina retina. La retina está compuesta de varias capas, siendo una de ellas la capa fotorreceptora que contiene los conos, que son los responsables de la

visión del color, y los bastones para la visión con luz tenue. La mayoría de los conos están situados en una pequeña área delimitada denominada mácula.

5 El humor acuoso presenta funciones nutritivas en particular para las estructuras avasculares del ojo como la córnea, el cristalino y el cuerpo vítreo. El humor acuoso se produce de forma continua mediante los procesos ciliares del epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar a una velocidad de aproximadamente 2,5 µL/minuto.

10 Los músculos extraoculares son los responsables de la movilidad del ojo. Se originan en el vértice orbitario y acaban en el globo ocular. En su curso, los músculos extraoculares también están unidos mediante el *septum* fibroso a la órbita. En la parte anterior, los planos de la fascia se unen a la cápsula de Tenon, encerrando la esclerótica. En el ojo humano, el "músculo extraocular" está constituido por cuatro músculos rectos y dos músculos oblicuos. Los músculos rectos están insertados en la parte anterior a aproximadamente 7 mm posterior al limbo. Los otros músculos extraoculares son los músculos orbitales que son los responsables de la apertura y cierre de las pestañas y las fibras de Muller que presentan conexiones con el músculo recto superior.

15 PROBLEMAS PARA EL SUMINISTRO DE FÁRMACOS EN EL OJO

20 Un problema importante en el tratamiento de las enfermedades y trastornos oculares es la dificultad de suministrar unos agentes biológicamente activos en el ojo a unas concentraciones terapéutica o profilácticamente eficaces. La administración oral de fármacos oculares resulta muy inadecuada para alcanzar los tejidos de la retina debido a las barreras hematorretinianas. Para que una cantidad eficaz de un agente terapéutico alcance la zona ocular, se debe administrar una concentración de fármaco elevada más frecuentemente. Esto puede provocar una toxicidad sistémica. Por ejemplo, la terapia de impulsos se puede utilizar para conseguir unos niveles elevados de corticosteroides en el ojo.

25 También existen problemas asociados a los procedimientos de administración tópica de fármacos oculares que se utilizan en la actualidad. La administración tópica normalmente solo es eficaz en patologías que implican la parte más superficial del ojo, es decir, la córnea y los segmentos anteriores. Los procedimientos de administración tópica de fármacos que se utilizan actualmente son realmente ineficaces para conseguir concentraciones adecuadas de fármaco en algunos tejidos oculares, particularmente en los tejidos intraoculares como el iris y el cuerpo ciliar. Resulta incluso más difícil alcanzar la retina, el nervio óptico o el cuerpo vítreo del ojo. Además, la administración tópica es incluso menos eficaz cuando el fármaco es una proteína o un péptido que normalmente carecen de la capacidad de cruzar la córnea haciendo que el tratamiento de las enfermedades oculares sea más difícil. Consecuentemente, los tratamientos más actuales para las enfermedades intraoculares son invasivos ya que frecuentemente requieren una inyección intraocular o cirugía intraocular (por ejemplo, la implantación quirúrgica de sistemas de liberación lenta o células encapsuladas modificadas).

35 Las inserciones extraoculares también presentan inconvenientes. La reaplicación frecuente es necesaria ya que el compuesto terapéutico se disuelve en cuestión de horas. De nuevo, estas inserciones sólo suministran el fármaco a la córnea y a la cámara anterior.

40 Por lo tanto, a pesar de los intentos descritos anteriormente de proporcionar un tratamiento eficaz, todavía existe una necesidad profunda y prolongada de nuevos enfoques para el tratamiento de las enfermedades oculares, en particular las enfermedades intraoculares.

45 Sería de especial interés definir procedimientos adecuados para la introducción de productos terapéuticos en el ojo, en particular proteínas y ácidos nucleicos, para controlar estas enfermedades. Dezawa *et al.* [(Micron 33:1-6 (2002))] describen una transferencia de genes en las células ganglionares de la retina (RGCs) mediante electroporación *in vivo* después de una inyección intravítrea. La terapia génica, en particular, está surgiendo como un enfoque eficaz para el manejo y el tratamiento de diversas enfermedades. Los ejemplos de regímenes de terapia génica eficaces aparecen sistemáticamente en la bibliografía [ver, por ejemplo, Roth *et al.*, Nature Medicine, Vol. 2, 985-991 (1996), o Hermiston and Kirn, Mol Therapy, vol. 11, 496-508, (2005)]. La transferencia génica terapéutica ofrece ventajas potenciales como la producción continuada y/o dirigida del transgén deseado *in vivo*. Sin embargo, actualmente resulta difícil realizar una transducción de ácido nucleico en células oculares de mamíferos con un elevado grado de eficacia. Especialmente, resulta problemático introducir estos ácidos nucleicos en el ojo sin la inducción de una respuesta inflamatoria. Además, existe una carencia de mecanismos para transducir terminalmente células humanas diferenciadas o proliferadoras en el ojo. La presente invención satisface estas antiguas necesidades y deseos en la técnica.

60 En el contexto de la presente invención se ha desarrollado ciertamente un procedimiento para el suministro de un agente farmacológicamente activo, en particular un ácido nucleico terapéutico o profiláctico, en el área ocular, que comprende la administración de dicho agente en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el tejido muscular o células extraoculares de un sujeto.

Sumario de la invención

- 5 La presente invención proporciona en la actualidad unas composiciones y unos procedimientos para la prevención o el tratamiento seguro y eficaz de una enfermedad ocular de un sujeto animal, preferentemente un mamífero, especialmente un humano. La presente invención se basa en el descubrimiento de que el cuerpo ciliar (que comprende el tejido muscular ciliar y el epitelio ciliar), preferentemente el músculo ciliar, y/o el músculo extraocular se puede utilizar como un depósito de liberación de productos farmacéuticos para la esfera ocular, en particular para las partes internas y posteriores del ojo.
- 10 La presente descripción presenta un procedimiento especialmente eficaz para la transferencia selectiva de un agente biológica o farmacológicamente activo, especialmente un ácido nucleico, en la esfera ocular de un sujeto que comprende la administración de dicho agente en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar. Se expone asimismo la posibilidad de administración del agente en el tejido o células musculares extraoculares.
- 15 En la presente memoria se da a conocer asimismo la utilización de dicho procedimiento para la prevención o el tratamiento de enfermedades oculares, que comprenden de manera no limitativa enfermedades inflamatorias, enfermedades isquémicas, enfermedades proliferativas, enfermedades neurodegenerativas y glaucoma, tanto por separado como en combinación con otros tratamientos.
- 20 Un segundo aspecto descrito en la presente memoria es la utilización de un ácido nucleico terapéutico para la preparación de una composición para el tratamiento de una enfermedad ocular mediante la administración de dicha composición al/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o al tejido o células musculares extraoculares del sujeto que se va a tratar.
- 25 La descripción también presenta un dispositivo de electroporación para la administración de un agente o una composición al/a los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o al tejido o las células musculares extraoculares de un sujeto, que comprende:
- 30 (i) por lo menos un mecanismo para inyectar la composición en dicho(s) tejido(s) o células, en el que dicho mecanismo para inyectar es una aguja de inyección, un electrodo de aguja para inyección, una matriz de microagujas que comprenden por lo menos una aguja para inyección o un electrodo de aguja para inyección o una combinación de ellas,
- 35 (ii) opcionalmente, un mecanismo para detectar cuando se ha insertado la aguja a una profundidad suficiente para comenzar a inyectar la composición, estando dicha profundidad comprendida preferentemente entre 0,1 y 10 mm, todavía más preferentemente entre 0,1 a 0,9 mm,
- 40 (iii) opcionalmente, un mecanismo para colocar dicho mecanismo para inyectar en la superficie de la esclerótica o en la conjuntiva del ojo, y
- (iv) opcionalmente, un mecanismo para generar una señal eléctrica predeterminada.
- También se da a conocer la utilización, en terapia génica, de dicho dispositivo de electroporación.
- 45 Lo expuesto anteriormente y otras muchas características y las ventajas respectivas en relación a la presente invención se detallan a continuación. Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción siguiente de sus formas de realización preferidas.

Leyendas de las figuras

- 50 Figura 1: electrotransferencia *in vivo* en el ojo de una rata.
- A: inyección a través del túnel de la córnea en el músculo ciliar que conduce a la formación de una burbuja perilímbica.
- 55 B: electrodo intraocular y electrodo perfilimbico extraocular durante el procedimiento de electrotransferencia.
- C: aspecto del lugar de electrotransferencia justo después de la aplicación en curso.
- 60 D: dibujo del electrodo anular periocular de retorno.
- Figura 2: expresión de la GFP en secciones transversales de la región ciliar después de la inyección y de la electrotransferencia del plásmido pEGFP-C1.
- 65 A: histología hematoxilina eosina que representa el músculo ciliar (inserción).

a: aumento superior que representan las fibras longitudinales (flechas) y las fibras circulares (puntas de flechas).

B: histoquímica de la GFP localizada en el músculo ciliar. Las flechas indican varias regiones tisulares que expresan de forma elevada la GFP. Los núcleos están teñidos con DAPI (se indican varios ejemplos en círculos).

C: Inmunohistoquímica de la alfa-actina del músculo liso que representa las fibras lisas del músculo ciliar. Las flechas indican varias regiones de tejidos que expresan de forma elevada la actina. Los núcleos están teñidos con DAPI (se indican varios ejemplos en círculos).

Figura 3: localización de la expresión de la GFP en secciones frontales de la región ciliar después de la inyección y electrotransferencia del pEGFP-C1.

A: histología de la tinción hemalum-eosina que representa las fibras circulares del músculo ciliar.

B: Expresión de la GFP en las fibras circulares del músculo ciliar. Las regiones de tejido que expresan de forma elevada la GFP se representan dentro de cajas. Los núcleos están teñidos con DAPI (se indican varios ejemplos en círculos).

C: Expresión de la GFP en las fibras longitudinales del músculo ciliar. Las regiones de tejido que expresan de forma elevada la GFP se representan dentro de cajas. Los núcleos están teñidos con DAPI (se indican varios ejemplos en círculos).

D: Inmunohistoquímica de la alfa -actina del músculo liso que representa las fibras circulares del músculo ciliar. Las regiones de tejido que expresan de forma elevada actina se representan dentro de cajas.

E: colocalización de la alfa a-ctina del músculo liso y la GFP que demuestra que la expresión de la GFP se sitúa en las fibras ciliares del músculo. Las regiones de expresión colocalizadas mostradas por la fluorescencia amarilla resultado de la adición de fluorescente rojo y verde se representan dentro de cajas. Los núcleos están teñidos con DAPI (se indican varios ejemplos en círculos).

Figura 4: Localización de la expresión de la GFP en las secciones frontales después de la inyección del pEGFP-C1.

A: Expresión de la GFP en algunas células dispersas del cuerpo ciliar. Las flechas indican varias regiones de tejidos que expresan de forma elevada la GFP.

a: Aumento elevado. Las flechas indican varias regiones de tejidos que expresan de forma elevada la GFP. Los núcleos están teñidos con DAPI (se indican varios ejemplos en círculos).

Figura 5: Cinética de la expresión de la LUC en la región ciliar.

Se inyectaron 3µg de plásmido pVAX2 luc en el músculo ciliar de ambos ojos. A la inyección le siguió electrotransferencia en el ojo izquierdo de las ratas. A los días 6, 12, 22 y 30 se sacrificaron seis de las ratas.

Figura 6: Histología de la región ciliar 5 días después de la electrotransferencia que representa la integridad de las estructuras oculares. Particularmente, no se observa ni infiltración celular ni granulomas en el lugar de la electroporación. A los 5 días después de la electrotransferencia, no se detectaron células TUNEL positivas, lo que representa la ausencia de células apoptóticas en este punto.

Figura 7: Resultados clínicos de la EIU.

A: resultados clínicos de la EIU.

Fotografía con lámpara de hendidura de un ojo con EIU y sin tratamiento (B) (escala 5), o después de la electrotransferencia de 3µg de plásmido pEGFP-C1 GFP (C) (escala 0).

*: $P < 0,0001$ versus control o solución salina + ET ó pVAX2 + ET.

Figura 8: Histología de los resultados de la EIU.

A: valor medio de células infiltradas en los segmentos anterior y posterior de los ojos con EIU después de distintos regímenes de tratamiento.

** : $P < 0,005$ versus el control; t : $P < 0,0002$ versus pVAX2 + ET ; ## : $P < 0,0001$ versus pVAX2 hTNRF-Is/mlgG1-ET; * : $P < 0,005$ versus control; # : $< 0,005$ versus pVAX2 hTNRF-Is/mlgG1-ET.

B: microfotografías de las secciones del ojo de ratas control (a: córnea), (b: iris/cuerpo ciliar), (c: nervio óptico), y

de ratas tratadas con ET de 3 µg de hTNRF-Is/mlgG1. (d: córnea), (e: iris/cuerpo ciliar), (f: nervio óptico).

Figura 9: Anatomía del ojo.

5 Figura 10: Velocidades de secreción de la luciferasa Gaussia (Luciferasa-G o Gluc), 7 días después de la inyección y la electrotransferencia del plásmido *pCMV-Gluc* (15 µg) en el músculo ciliar y en la córnea. La velocidad de secreción se mide utilizando un espectroscopio que mide la luminiscencia [expresada en cuentas por segundo (cps)].

10 Figura 11: Velocidades de secreción de la luciferasa Gaussia (Luciferasa-G ó Gluc), 7 días después de la inyección y la electrotransferencia con varias condiciones eléctricas (voltaje, duración de los impulsos, número de impulsos y frecuencia) del plásmido *pCMV-Gluc* (15 µg) en el músculo ciliar. La velocidad de secreción se mide utilizando un espectroscopio que mide la luminiscencia [expresada en cuentas por segundo (cps)].

15 Figura 12: Secreción de las proteínas luciferasa Gaussia (luciferasa-G ó Gluc), hTNRF-Is/mlgG1 y las proteínas mEPO en el humor acuoso y vítreo, 7 días después de la inyección y la electrotransferencia de los plásmidos que expresan hTNRF-Is/mlgG1 y las proteínas Gluc (15 µg) y del plásmido *pVAX2mEpo* (10 µg) en el músculo ciliar.

20 Figura 13: eficacia del plásmido *pVAX2 hTNFR-Is/mlgG1* (30 µg) en los resultados clínicos de la uveítis (EIU) inducida por endotoxina después de la inyección (sin electrotransferencia) en el cuerpo ciliar de la rata. La inyección de 30 µg de un plásmido que codifica para la TNFR-Is en el cuerpo ciliar permite una velocidad de secreción de 274±77 pg/ml de TNFR-Is en el humor acuoso.

25 Figura 14: eficacia del plásmido *pVAX2 hTNFR-Is/mlgG1* (30 µg) en los resultados histológicos de la uveítis (EIU) inducida por endotoxina después de la inyección (sin electrotransferencia) en el cuerpo ciliar de la rata, expresado con el valor medio de células infiltradas respectivamente en los segmentos anterior y posterior del ojo. La inyección de 30 µg de un plásmido que codifica para la TNFR-Is en el cuerpo ciliar permite una velocidad de secreción de 274±77 pg/ml de TNFR-Is en el humor acuoso.

30 Figura 15: secreción de la luciferasa Gaussia (luciferasa-G ó Gluc) 7 días después de la inyección y la electrotransferencia del plásmido *pCMV-Gluc* (15 µg) en el músculo ciliar utilizando varios dispositivos de electrodos que comprenden un mecanismo anular y un mecanismo de agujas o un mecanismo anular y un mecanismo de cables. El campo eléctrico aplicado está constituido por 8 impulsos, cuya intensidad de campo es de 200 V/cm. La duración total de la aplicación del campo eléctrico es de 20 ms por cada impulso. La frecuencia es de 5 Hz. La inversión de la polaridad entre los electrodos no modifica la eficacia de la liberación del gen.

35 Figura 16: Ejemplo de un dispositivo con forma de anillo que comprende dos electrodos. Cada punta de los mecanismos en forma de cresta (gris) se puede utilizar para la inyección y/o como un electrodo. El segundo mecanismo (negro) es un electrodo que se puede separar del primer mecanismo o se puede unir a él para proporcionar una distancia fija (entre 2 y 5 mm) entre los dos mecanismos.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención presenta un procedimiento especialmente eficaz para la transferencia selectiva de un agente o producto biológicamente activo, en particular un ácido nucleico, en las células oculares, en particular en la parte interna o posterior del ojo. En la presente documento se demuestra que es posible transferir de forma específica un ácido nucleico en las células oculares diana mediante la administración en el/los tejido(s) o las células del cuerpo ciliar (que comprende el músculo ciliar, en particular el músculo liso ciliar, y el epitelio ciliar). También es posible transferir un ácido nucleico en las células oculares diana mediante la administración en el/los tejido(s) o células del

50 músculo extraocular (que comprende el músculo orbicular), posiblemente además de la administración en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar. En la presente memoria se describe que los productos terapéuticos o profilácticos, en particular ácidos nucleicos terapéuticos o profilácticos, se administran de forma ventajosa a nivel de el/los tejido(s) o las células del cuerpo ciliar (y/o del tejido o células del músculo extraocular), y distribuirse a las células oculares enfermas. La inyección de un ácido nucleico que expresa un producto terapéutico o profiláctico en

55 estos tejido(s) o células proporciona una manera especialmente atractiva de administración para suministrar agentes activos en la esfera ocular. Verdaderamente, se representa que el ácido nucleico administrado de esta manera transducirá dichas células musculares, lo que de este modo permite la expresión y/o secreción del producto codificado por dichas células. La secreción permite una liberación continua del producto de la expresión en el cuerpo vítreo y/o en el humor acuoso (el medio ocular) lo cual permitirá el tratamiento de los tejidos intraoculares del ojo

60 deseados, preferentemente las partes específicas del ojo como, por ejemplo, el iris, el cuerpo ciliar, la retina, el nervio óptico o el mismo cuerpo vítreo del ojo. La administración en el interior del cuerpo ciliar (y/o la administración en el interior del músculo extraocular) del ácido nucleico terapéutico o profiláctico conduce a una gran producción y distribución de dicho producto en el ojo, los que permite un tratamiento con un alto rendimiento de las áreas aculares enfermas.

65 La administración (tejido del músculo ciliar o células y/o epitelio o células epiteliales) en el interior del cuerpo ciliar

(y/o la administración en el interior del músculo extraocular) de un ácido nucleico terapéutico constituye un nuevo procedimiento y muy eficaz para el tratamiento de las células oculares. La presente invención permite apuntar al tejido intraocular en el que se desea actuar, según la localización del traumatismo y/o la degeneración. En particular, la presente invención permite de manera ventajosa apuntar a las células de los diferentes tejidos oculares, por ejemplo, añadiendo una secuencia diana hacia el producto farmacológico. La presente invención ha evidenciado ser menos traumática y más específica que una inyección estereotóxica en la frente (opcionalmente al nivel del ojo) la cual es más difusa y no está restringida al globo ocular. La presente invención también es mucho más eficaz ya que permite una producción continuada y/o dirigida del producto terapéutico deseado *in vivo* en comparación con una administración directa de dicho producto, por ejemplo, en el cuerpo vítreo.

Por lo tanto, en la presente memoria se describe la utilización de un agente biológica o farmacológicamente activo, preferentemente un ácido nucleico terapéutico o profiláctico, para preparar una composición para el tratamiento o la prevención de una enfermedad ocular, mediante la administración de dicha composición, en particular en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar (y/o en el tejido o células del músculo extraocular) del sujeto en tratamiento. En particular, la invención solicitada implica la administración a los tejidos o células del músculo ciliar.

Cuando se transfecta específicamente el epitelio ciliar, se utiliza para traducir proteínas o péptidos que pueden regular la producción del humor acuoso, particularmente para el tratamiento de presiones intraoculares elevadas. En el caso de la transfección del epitelio ciliar, el péptido o las proteínas traducidas están diseñadas para regular la producción del humor acuoso localmente y, por lo tanto, la administración local es necesaria en estos casos.

ADMNISTRACIÓN

Aunque con los años se ha acumulado un conocimiento importante, como se ha expuesto anteriormente en la presente memoria, se presentan frecuentemente muchos problemas asociados con la administración *in vivo* de productos, en particular péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, en células eucariotas mediante los procedimientos convencionales. Normalmente, los péptidos, las proteínas y los ácidos nucleicos como los aptámeros o los oligonucleótidos antisentido frecuentemente se han de inyectar utilizando agujas invasivas para obtener un efecto terapéutico. De igual forma, cuando se suministra ADN para la transfección, sólo un pequeño porcentaje de las células diana que han de ser transfectadas con el ácido nucleico heterólogo expresan realmente el producto de interés a unos niveles satisfactorios, en particular el ARNm o proteína de interés transcrita y traducida a partir del transgén transfectado. Además, algunas composiciones terapéuticas, como las que incluyen oligonucleótidos transgénicos, son muy costosas, tóxicas y degradables, y, consecuentemente, requieren una aplicación muy localizada, una internalización eficaz en las células diana, y unas administraciones frecuentes. Finalmente, resultaría ventajoso suministrar localmente una proteína con un riesgo de toxicidad general indeseable, como una citocina, un anticuerpo, una anticitocina, como los receptores solubles anti-TNF α , u otras proteínas de la técnica actual. Por ejemplo, se ha demostrado que la administración sistemática del receptor soluble anti-TNF α aumenta el riesgo de tuberculosis.

Los procedimientos y las utilidades que se dan a conocer en la presente memoria están concebidos para producir una expresión local prolongada de un agente o producto biológicamente activo. En la presente memoria se da a conocer que la administración de un agente biológicamente activo, en particular un ácido nucleico terapéutico o profiláctico, o una composición que comprende dicho agente, en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar (y/o en el tejido o células del músculo extraocular), provoca que dichos tejidos o células produzcan o secreten un agente a unas dosis fisiológicas y/o terapéuticas o profilácticas. El producto de expresión muscular se puede, por ejemplo, distribuir en las células oculares enfermas mediante una liberación continuada en el cuerpo vítreo y/o en el humor acuoso.

La administración de un agente biológicamente activo, especialmente un ácido nucleico terapéutico o profiláctico, o una composición que comprende dicho agente en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar (y/o en el tejido o células del músculo extraocular) del sujeto en tratamiento, se describe en la presente memoria.

La administración o transferencia directa del agente biológicamente activo en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar (y/o en el tejido o células del músculo extraocular) se puede realizar utilizando una serie de técnicas, como la electroporación, el tratamiento quirúrgico, el tratamiento térmico, la iontoforesis, la sonoforesis, utilizando unas partículas recubiertas con el agente biológicamente activo liberadas neumáticamente como unas partículas de oro utilizadas en una "pistola de genes". Con un dispositivo de disparo de partículas, o "pistola de genes", se genera una fuerza motriz para acelerar las partículas de alta densidad recubiertas (como oro o tungsteno) a una velocidad elevada que permite la penetración en los tejidos o células del ojo.

También es posible utilizar una vía transconjuntiva, transesclerótica, transcorneal, intraocular (preferentemente durante la cirugía) o endoscópica; la inyección se puede realizar durante la vitrectomía en con una infusión quirúrgica de gas o sin ella. La administración se puede realizar mediante un único lugar de inyección o en múltiples sitios de inyección.

Resulta preferido administrar el agente biológicamente activo directamente en el/los tejido(s) o células del cuerpo

ciliar (y/o en el tejido o células del músculo extraocular), incluyendo preferentemente una etapa de inyección del agente biológicamente activo en dicho músculo(s). Esta inyección directa se puede realizar por una vía transconjuntival, transesclerótica o transcorneal.

5 Resulta asimismo preferido realizar la administración mediante electroporación (también denominada "electrotransferencia") o con una etapa de electroporación, además de la etapa de inyección. La electroporación comprende la aplicación de un campo eléctrico que se describirá más detalladamente a continuación en la solicitud.

10 En el contexto de la presente invención se ha descubierto que esta inyección mecánica o física de ácidos nucleicos biológicamente activos en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar (y/o en el tejido o células del músculo extraocular) produce un alto porcentaje de células transfectadas y presenta una expresión mantenida del marcador.

15 Para una mayor compleción, se debería indicar que la administración no directa se puede desarrollar como alternativa a uno de los procedimientos mencionados anteriormente. La administración no directa, como se aprecia en la presente memoria, comprende normalmente la inyección de un producto farmacéutico en el fluido corporal como el torrente sanguíneo, en el que el producto farmacéutico comprende ventajosamente una secuencia señal dirigida a el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar (y/o el tejido o células del músculo extraocular). La administración no directa también se puede realizar utilizando un procedimiento de endocitosis basado en el receptor celular o utilizando una captación mediada químicamente, en la que un ligando (específico a un receptor de la superficie celular) se prepara para formar un conjunto con el producto farmacéutico, preferentemente un ácido nucleico de interés. Después, el conjunto se inyecta en el fluido corporal como el torrente sanguíneo del sujeto. Las células diana que presentan el receptor de la superficie celular se unirán específicamente al ligando y transportarán el complejo producto-ligando a la célula.

25 La captación mediada químicamente puede ser una transfección de fosfato de calcio o puede implicar la utilización de vesículas lipídicas fusogénicas como liposomas u otras vesículas para la fusión de la membrana. Se puede introducir convenientemente un vehículo que contenga el producto farmacéutico de interés, preferentemente un ácido nucleico de interés, en el fluido corporal y después dirigirlo específicamente a el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar (y/o el tejido o células del músculo extraocular). Por ejemplo, se pueden desarrollar liposomas terapéuticos o profilácticos específicos portadores del producto de tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o de tejido o células del músculo extraocular y el producto será transportado por el liposoma absorbido por estas células específicas. Se puede utilizar la inyección de inmunoliposomas que están dirigidos a un receptor específico en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el tejido o células del músculo extraocular como un procedimiento conveniente de inserción del producto terapéutico o profiláctico en las células del músculo ocular que portan el receptor.

40 La liberación mecánica, física o química en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el tejido o células del músculo extraocular, o una combinación de estos diferentes procedimientos, pueden implicar la utilización previa de enzimas como la hialuronidasa, la dispasa, la quimotripsina alfa, etc., que mejorarán la difusión del fármaco en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el tejido o células del músculo extraocular, y finalmente mejorarán la absorción celular.

45 Una vez que se encuentren en las células, las secuencias de nucleótidos se pueden preparar para producir la sustancia terapéutica en los medios (tanto episomal como después de la integración cromosómica) celular o nuclear (núcleo). Las secuencias de nucleótidos incorporadas al núcleo pueden producir, como se ha expuesto anteriormente, el producto terapéutico durante largos periodos de tiempo e incluso permanentemente.

50 El producto terapéutico o profiláctico deseado también se puede volver a administrar periódicamente para mantener el nivel del producto, por ejemplo, cuando el producto es un ácido nucleico, para mantener el nivel de los ácidos nucleicos sin que tenga lugar una mutación en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el tejido o células del músculo extraocular receptores.

ELECTROPORACIÓN

55 De entre los procedimientos que permiten o mejoran la transferencia *in vivo* de ácidos nucleicos en las células diana, se puede mencionar especialmente la electroporación. Los mecanismos de electroporación son responsables, o aumentan, la permeabilidad de una membrana celular y/o por lo menos una parte de un tejido diana para un agente biológicamente activo como un ácido nucleico. Además, se utiliza un breve impulso eléctrico con una fuerza de campo específica para permitir el transporte o la migración de agentes a través del tejido o a través de las membranas celulares al interior de la célula, mediante un efecto electroforético. La técnica de electroporación es bien conocida por los expertos en la materia.

65 Este procedimiento funciona basándose en el principio de que las células actúan como un condensador eléctrico que normalmente no permite el paso de la corriente eléctrica. Al someter a las células a un campo eléctrico se crean unas estructuras o unos microporos permeables transitorios en la membrana celular. Los poros son lo suficientemente grandes como para que los productos farmacéuticos y/o el ácido nucleico puedan entrar en las

5 células. Como resultado de los “poros” que se forman brevemente en la membrana celular, las moléculas biológicamente activas entran inicialmente en el citoplasma o el núcleo en los que ya pueden ejercer su función para ser estudiada si es necesario. Con el tiempo, los poros de la membrana celular se cierran y la célula permanece de nuevo impermeable. Además del efecto del poro, el polianiónico, el nucleótido con carga eléctrica también es conducido al tejido y las células mediante el efecto electroforético de los impulsos eléctricos aplicados.

10 En la presente memoria se demuestra que la transferencia del agente biológicamente activo al/ a los tejido(s) o células del cuerpo ciliar (y/o, posiblemente, al tejido o células del músculo extraocular, se puede facilitar o incrementar aplicando al/a los tejido(s) oculares deseados un campo eléctrico constituido por uno o más impulsos eléctricos, la intensidad del campo es de entre aproximadamente 1 a 600 voltios/cm, preferentemente de 1 a 400 voltios/cm, todavía más preferentemente entre aproximadamente de 50 a 200 voltios/cm, ventajosamente entre aproximadamente 50 y 150 voltios/cm, 75 a 150 voltios/cm ó 50 a 100 voltios/cm. Una intensidad de campo eléctrico especialmente preferida utilizable en la presente invención es una intensidad de 200 voltios/cm.

15 La duración total de la aplicación del campo eléctrico puede encontrarse entre 0,01 milisegundos y 1 segundo, preferentemente entre 0,01 y 500 milisegundos, más preferentemente entre 1 y 500 milisegundos, todavía más preferentemente superior a 1 ó 10 milisegundos. En una forma de realización preferida, la duración total de la aplicación del campo eléctrico es de entre 10 milisegundos y 100 milisegundos y es preferentemente de 20 milisegundos.

20 Los impulsos eléctricos aplicados pueden encontrarse entre, por ejemplo, 1 y 100.000. Su frecuencia puede estar comprendida entre 0,1 y 1.000 hertzios. Resulta preferida una frecuencia regular.

25 Los impulsos eléctricos también se pueden suministrar de una forma irregular en relación a cada uno, la función que describe la intensidad del campo eléctrico como una función del tiempo para un impulso es preferentemente variable.

30 El campo eléctrico suministrado puede ser, por ejemplo, la combinación de por lo menos un primer campo eléctrico superior a 400 voltios/cm de menos de 1 milisegundo y uno o más impulsos eléctricos inferiores a 400 voltios/cm y aproximadamente 1 milisegundo. El campo eléctrico suministrado puede además ser, por ejemplo, la combinación de por lo menos un primer campo eléctrico superior a 200 voltios/cm de menos de 1 milisegundo y uno o más impulsos eléctricos inferiores a 200 voltios/cm y aproximadamente 1 milisegundo.

35 La integral de la función que describe la variación del campo eléctrico durante el transcurso del tiempo es preferentemente superior a 1 kV x mseg/cm, todavía más preferentemente superior o por lo menos igual a 5 kV x mseg/cm.

40 En una forma de realización preferida, el campo eléctrico aplicado al tejido o a las células está comprendido entre 1 y 10 impulsos, preferentemente 8 impulsos, de una frecuencia de entre 1 y 10 Hz, preferentemente de 5 Hz.

45 Los impulsos eléctricos pueden ser impulsos de ondas unipolares o bipolares. Se pueden seleccionar, por ejemplo, de entre impulsos de ondas cuadradas, impulsos de ondas exponencialmente decrecientes, impulsos de ondas unipolares oscilantes de duración limitada, impulsos de ondas bipolares oscilantes de duración limitada, u otras formas de ondas. Preferentemente, los impulsos eléctricos comprenden impulsos de ondas cuadradas o impulsos de ondas bipolares oscilantes.

50 En una forma de realización particular de la invención, la administración comprende una etapa de electroporación que implica la aplicación, al/a los tejido(s), de un campo eléctrico que comprende 8 impulsos de ondas cuadradas unipolares, de una frecuencia de 5 Hz, la intensidad de cada impulso es de 200 voltios/cm durante una duración total de la aplicación del campo eléctrico de 20 ms por impulso.

55 La electroporación se lleva a cabo normalmente aplicando impulsos de voltaje entre un par de electrodos que se aplican sobre la superficie tisular. El voltaje se debe aplicar en proporción a la distancia entre los electrodos. Cuando la distancia entre los electrodos es demasiado grande, el campo eléctrico generado penetra con profundidad en el tejido en el que provoca una reacción nerviosa y muscular desagradable.

60 En la presente invención, los impulsos eléctricos se aplican preferentemente utilizando por lo menos dos electrodos a una distancia el uno del otro inferior a un centímetro, que se introduce, por lo menos uno de estos electrodos, en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar o en el tejido o las células del músculo extraocular. Preferentemente, por lo menos uno de estos electrodos se aplica sobre la superficie de la esclerótica o la conjuntiva ocular, preferentemente la conjuntiva límbica.

65 Los electrodos están preferentemente a una distancia el uno del otro inferior a 10 milímetros, más preferentemente inferior a 9, 8, 7, 6, 5, 4 ó 3 milímetros, todavía más preferentemente inferior a 2 milímetros o 1 milímetro.

En la utilización descrita anteriormente, es posible llevar a cabo una etapa de iontoforesis antes, durante o después

de la etapa de electroporación, preferentemente antes de dicha etapa. La iontoforesis consiste en administrar un producto en el cuerpo a través de los tejidos utilizando un campo eléctrico que implica una densidad de corriente pequeña (como por ejemplo una densidad que se encuentra entre 0,5 y 2 mA/cm²). Se coloca un electrodo en el sitio a tratar mientras que un segundo electrodo, con el que se pretende cerrar el circuito eléctrico, se coloca en otro lugar del cuerpo. El voltaje de esta iontoforesis está comprendido entre 0,001 y 40 V/cm, y dura entre varios segundos y varias horas (para la iontoforesis transpalpebral), hasta preferentemente 10 minutos, incluso hasta más preferentemente 7 minutos ó 5 minutos (cuando la iontoforesis se aplica directamente sobre el ojo).

Habitualmente se utilizan unos dispositivos para la liberación transdérmica y transcutánea de agentes terapéuticos mediante iontoforesis para el tratamiento de enfermedades cutáneas u oculares y éstos ya se han dado a conocer. Por lo tanto, el experto en la materia podrá fácilmente seleccionar y determinar el dispositivo para la iontoforesis y sus condiciones de uso, especialmente la densidad vigente, el periodo de tiempo de aplicación de la corriente y la forma y localización de los electrodos, etc., adaptadas al tejido ocular que contienen las células diana. Entre los dispositivos que se pueden utilizar para la liberación intraocular de un agente biológicamente activo, preferentemente un ácido nucleico, como se ha definido anteriormente, en el procedimiento según la presente invención, el sistema de iontoforesis que se da a conocer en la patente US nº 6.154.671 es el preferido.

DISPOSITIVO

A continuación se expone un dispositivo que se puede utilizar en un procedimiento de liberación según la presente invención. Aunque no es obligatorio conseguir la inyección de una composición, como la que se describe en la presente memoria, en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar (o en el tejido del músculo extraocular), un procedimiento especial de liberación está constituido o comprende una etapa de electroporación.

Por lo tanto, la presente descripción da a conocer un dispositivo de electroporación para la administración en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar o en el tejido o células del músculo extraocular de un sujeto, que comprende:

- (i) por lo menos un mecanismo para inyectar la composición en dicho tejido(s) o células, en el que dicho mecanismo para inyectar es una aguja para inyección, un electrodo aguja para inyección, una matriz de microagujas que comprende por lo menos una aguja para inyección o un electrodo de aguja para inyección, o su combinación,
- (ii) opcionalmente, un mecanismo para detectar cuando se ha insertado la aguja a una profundidad necesaria para empezar a inyectar la composición, dicha profundidad está comprendida entre 0,1 y 10 mm, preferentemente 0,2 y 0,9 mm (ventajosamente esta profundidad es de aproximadamente o exactamente 0,5 mm)
- (iii) opcionalmente, un mecanismo para colocar dicho mecanismo de inyección en la superficie de la esclerótica o la conjuntiva ocular, y
- (iv) opcionalmente, un mecanismo para generar una señal eléctrica predeterminada.

Los mecanismos para inyectar la composición pueden ser una aguja para inyección o un electrodo de aguja para inyección, una matriz de microagujas que comprende por lo menos una aguja para inyección o un electrodo de aguja para inyección, o su combinación. Se pueden encontrar orificios a lo largo de la longitud de la aguja(s) para inyección y/o el electrodo(s) de aguja para inyección así como al final de la misma para mejorar la distribución de las sustancias inyectadas. Además, una o más de las agujas para inyección y/o los electrodos de aguja para inyección pueden estar huecos y pueden incluir aperturas a través de las cuales el agente terapéutico o profiláctico se puede inyectar en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar (y/o en el músculo o células extraoculares). Alternativamente, los mecanismos para inyectar la composición puede ser cualquier mecanismo conocido por el experto en la materia, como un dispositivo pistola genética, un catéter, etc.

La longitud de la aguja para inyección o del electrodo de aguja para inyección puede estar comprendida entre 0,1 mm y 4 cm (por ejemplo, 3,2 ó 1,5 cm). La longitud de la parte de la aguja para inyección o el electrodo de aguja para inyección que penetra en el tejido diana (tejido(s) del cuerpo ciliar o tejido del músculo extraocular) está comprendido ventajosamente entre 0,1 mm y 2 cm, preferentemente entre 0,1 mm y 10 mm, todavía más preferentemente entre 0,2 mm y 0,9 mm (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, ó 8 mm). La longitud la aguja para inyección o del electrodo de aguja para inyección está comprendida preferentemente entre aproximadamente 0,1 y 0,9 mm (por ejemplo, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, ó 0,8 mm) y es preferentemente de aproximadamente o exactamente 0,5 mm.

El dispositivo puede comprender además un mecanismo para detectar cuándo se ha insertado la aguja a una profundidad suficiente para empezar a inyectar la composición, dicha profundidad está comprendida entre 0,1 y 10 mm, preferentemente 2 y 9 mm. Por ejemplo, esta profundidad es de aproximadamente o exactamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, ó 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, ó 5 mm.

Se puede decidir cuándo empezar la inyección de la composición dada a conocer en la presente memoria. De forma ideal, la inyección se empieza cuando la punta de la aguja ha alcanzado el tejido del cuerpo ciliar de interés

- (músculo o epitelio) o el tejido muscular extraocular y el dispositivo incluye preferentemente un mecanismo para detectar cuando se ha insertado la aguja a una profundidad suficiente para empezar la inyección de la composición. Esto significa que se puede hacer que la inyección de la composición empiece automáticamente cuando la aguja ha alcanzado la profundidad deseada (que normalmente será la profundidad a la que comienza el tejido muscular). La profundidad a la que empieza el tejido muscular se puede determinar que sea, por ejemplo, una profundidad preprogramada de inserción de la aguja comprendida entre 0,1 y 10 mm, preferentemente, 2 y 9 mm. Por ejemplo, esta profundidad puede ser de aproximadamente o exactamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, ó 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, ó 5 mm, que será considerada suficiente para que la aguja pase a través de la esclerótica o la conjuntiva ocular.
- 5
- 10 En un aspecto preferido el mecanismo de detección comprende una sonda ultrasónica.
- En un aspecto alternativo preferido el mecanismo de detección comprende un mecanismo para detectar un cambio en la impedancia o en la resistencia. En este caso, el mecanismo no registra como tal la profundidad de la aguja en el tejido corporal sino que más bien se adaptará para detectar un cambio en la impedancia o resistencia cuando la aguja se mueva de un tipo distinto de tejido corporal en el ojo.
- 15
- Si se desea, además la profundidad de la inserción de la aguja se puede registrar y se podría utilizar para controlar la inyección de la composición de forma que el volumen de la composición que se ha de inyectar se determina a medida que se registra la profundidad de inserción de la aguja.
- 20
- El dispositivo descrito anteriormente se puede utilizar para cualquier tipo de inyección. Sin embargo, está concebido para ser especialmente eficaz en el campo de la electroporación y por esto comprende además mecanismos para aplicar un voltaje a la aguja en particular para generar una señal eléctrica predeterminada. Esto permite que la aguja se utilice no sólo para la inyección sino también como un electrodo durante la electroporación.
- 25
- Esto es especialmente ventajoso ya que significa que el campo eléctrico se aplica sobre la misma área que la composición inyectada.
- En un aspecto preferido, el dispositivo para la inyección comprende por lo menos dos electrodos separados por una distancia inferior a un centímetro, la polaridad de por lo menos uno de estos electrodos es diferente a la del otro electrón(es). Ventajosamente, por lo menos uno de dichos electrodos de por lo menos los dos electrodos es un mecanismo para inyectar como se ha definido anteriormente en la presente memoria.
- 30
- Los electrodos se seleccionan preferentemente de entre de los electrodos de cable y electrodos de lámina de contacto, cada tipo de electrodo se adapta opcionalmente para que se aplique de forma reversible sobre la superficie de la esclerótica o la conjuntiva ocular, preferentemente la conjuntiva límbica (por ejemplo, cuando están por lo menos parcialmente en forma de anillo).
- 35
- En un primer enfoque, el electrodo de cable se puede introducir en el ojo a través de la conjuntiva y de la esclerótica, por ejemplo en el único túnel o en uno de los túneles realizados durante la inyección de la composición, preferentemente a una distancia de varios milímetros, preferentemente comprendida entre 1,5 y 4 mm del limbo (todavía más preferentemente a una distancia de 2,5 mm de limbo en el ojo del adulto). El cable se introduce por ejemplo paralelo al limbo. Después el cable puede penetrar en el cuerpo ciliar a una distancia comprendida entre aproximadamente 2 y 10 mm. Este electrodo de cable se puede utilizar con por lo menos un electrodo de lámina de contacto o con por lo menos otro electrodo de cable (por ejemplo de forma de anillo) o con una de sus combinaciones. Un electrodo con forma de anillo se puede utilizar, por ejemplo, como un electrodo de retorno e introducirse a través de la córnea, alrededor del limbo, por ejemplo a una distancia comprendida entre 1 y 9 milímetros, del / de los electrodo(s) intraoculares. Preferentemente se utilizan dos o más electrodos simultáneamente.
- 40
- 45
- 50 Cuando sólo se utilizan dos electrodos y ambos son, por ejemplo, electrodos en forma de anillo, un electrodo puede cubrir el otro sin inducir un efecto adverso.
- El electrodo de cable utilizado de la forma descrita anteriormente es ventajoso puesto que es menos invasivo que otros tipos de electrodos y es mucho más fácil de utilizar. El electrodo de cable permite también el aumento de la superficie eléctrica del electrodo y, por lo tanto, una mejor expresión del transgén.
- 55
- En un segundo enfoque la forma del electrodo de cable es la de un anillo o parte de un anillo. Este tipo de cable se adapta de forma ventajosa para que se aplique de forma reversible sobre la superficie de la esclerótica o la conjuntiva ocular, preferentemente la conjuntiva límbica. La longitud del electrodo de cable puede estar comprendida entre 1 milímetro y 3 centímetros, preferentemente entre 1 y 10 milímetros. El electrodo de cable puede ser más largo (de 5,3 centímetros o inferior) cuando se encuentra en forma de anillo. Por supuesto será más corto (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, ó 5 milímetros) cuando se adapta para introducirlo a través de la esclerótica.
- 60
- 65 El electrodo de lámina puede ser curvado o no. También se puede diseñar o no como un peine que comprende por lo menos dos puntas (preferentemente entre 3 a 20 puntas, por ejemplo 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,

18 ó 19 puntas), por lo menos una de estas puntas comprende el mecanismo de inyección del dispositivo. El ancho del electrodo de cable es preferentemente inferior a aproximadamente 1 centímetro, preferentemente inferior a 0,5 milímetros.

5 En un aspecto particular, el electrodo de lámina de contacto está realizado preferentemente en un material rígido con una forma curvada adaptada a la geometría de la superficie de la esclerótica o la conjuntiva ocular.

En un aspecto particular, el electrodo de lámina de contacto está realizado preferentemente en un material flexible adaptado a la geometría de la superficie de la esclerótica o la conjuntiva ocular.

10 Por lo menos los dos electrodos están preferentemente a una distancia el uno del otro inferior a 1,5 ó 1 centímetros, todavía más preferentemente inferior a 15 ó 10 milímetros, preferentemente inferior a 14, 13, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ó 2 milímetros. La distancia entre cada uno de los electrodos es preferentemente de 1 milímetro o incluso inferior.

15 Cuando el dispositivo comprende por lo menos dos electrodos, dichos electrodos pueden ser independientes o estar conectados conjuntamente.

Los electrodos están realizados ventajosamente en un metal inoxidable conductor seleccionado por ejemplo de entre iridio o paladio.

20 El dispositivo dado a conocer en la presente memoria puede comprender ventajosamente un mecanismo para colocar y/o mantener el mecanismo para la inyección descrito anteriormente en la presente memoria sobre la superficie de la esclerótica o la conjuntiva ocular antes y durante la inyección. El mecanismo de colocación se adapta ventajosamente para que se aplique de forma reversible sobre la superficie de la esclerótica o la conjuntiva ocular, preferentemente la conjuntiva límbica.

25 El mecanismo de posicionamiento puede estar conectado de forma reversible al mecanismo para inyectar. Puede estar además conectado a por lo menos un electrodo y/o a los mecanismos para detectar cuando se ha insertado la aguja a una profundidad suficiente en el ojo.

30 El mecanismo de posicionamiento puede ser un mecanismo en forma de anillo o una de sus partes. Puede estar realizado en un material rígido y puede ser de forma curvada adaptado a la geometría de la superficie de la esclerótica o la conjuntiva ocular y puede estar realizado en un material flexible adaptado a la geometría de la superficie de la esclerótica o la conjuntiva ocular.

35 En un aspecto particular, el mecanismo de posicionamiento del dispositivo se diseña como un peine, que puede estar curvado, comprende por lo menos dos puntas, por lo menos una de dichas puntas comprende un mecanismo para inyectar como el descrito anteriormente en la presente memoria.

40 El diámetro interno del mecanismo de posicionamiento en forma de anillo está comprendido preferentemente entre 10 y 20 mm, todavía más preferentemente entre 13 y 14 milímetros y el diámetro externo del mecanismo de posicionamiento en forma de anillo está comprendido preferentemente entre 15 y 25 mm, todavía más preferentemente entre 15 y 16 milímetros.

45 La longitud de las puntas está comprendida preferentemente entre 0,1 mm y 3 ó 1 mm, preferentemente 0,4 mm y 0,8 mm, e todavía más preferentemente es de 0,5 mm.

50 Los ángulos entre los mecanismos de posicionamiento en forma de anillo, o parte de ellos, y las puntas pueden variar en función de la profundidad de la inyección necesaria y pueden estar comprendidos entre 1° y 90°, por ejemplo 5°, 10°, 20°, 30°, 40°, 50°, 60°, 70° y 80°.

55 En un aspecto particular, los mecanismos de posicionamiento del dispositivo pueden presentar varios orificios a través de los cuales se pueden extender varias agujas de inyección y/o electrodos de aguja, el orificio que corresponde a los electrodos de aguja se conecta separadamente a un conductor de modo que cada uno de los electrodos se puede conectar a una fuente de alimentación en funcionamiento. Se puede colocar una porción aislante a lo largo de la porción media de cada electrodo de modo que se aísla el tejido corporal adyacente a la parte aislada de la aguja del campo eléctrico producido por el electrodo en funcionamiento.

60 En otro aspecto particular, los mecanismos de posicionamiento del dispositivo pueden tener forma de anillo y presentar unos electrodos insertados a ambos lados del anillo. Entonces se puede utilizar un primer conjunto de electrodos como mecanismo de inyección y simultáneamente como electrodos positivo o negativo mientras que los electrodos restantes (segundo conjunto de electrodos) presentan una polaridad diferente del primer conjunto de electrodos. Ambos conjuntos de electrodos se pueden insertar en el cuerpo ciliar (en particular, en el músculo ciliar). La distancia entre los electrodos se encuentra preferentemente entre 10 y 20 milímetros, todavía más preferentemente entre 12 y 17 milímetros. En este caso particular, no hay necesidad de que utilicen un electrodo de placa con retorno adicional.

65

Un dispositivo particular que forma parte de la presente invención comprende:

- 5 (i) por lo menos un mecanismo para la inyección de la composición en dicho(s) tejidos o células, en el que dicho mecanismo de inyección es una matriz de microagujas que comprende por lo menos dos electrodos de aguja para inyección,
- 10 (ii) opcionalmente, un mecanismo para detectar cuando la aguja o las agujas se han insertado a una profundidad suficiente para empezar la inyección de la composición, dicha profundidad está comprendida entre 0,1 y 10 mm, preferentemente 2 y 9 mm (ventajosamente esta profundidad es de aproximadamente o exactamente 0,7 ó 0,5 mm),
- 15 (iii) un mecanismo para colocar dicho electrodo de aguja para inyección o la matriz con microagujas en la superficie de la esclerótica o en la conjuntiva del ojo, dicho mecanismo de posicionamiento presentan una forma de anillo y está concebido como una cresta que comprende por lo menos dos puntas, dichas puntas comprenden cada una de ellas por lo menos dos electrodos de aguja de inyección, y
- (iv) unos medios para generar una señal eléctrica predeterminada.

20 En un dispositivo como el se ha descrito anteriormente, la matriz única de electrodos utilizados es el mecanismo de inyección, las descargas eléctricas se pueden suministrar utilizando una fuente de energía (mecanismos para la generación de una señal eléctrica) que proporciona una polaridad alterna de un electrodo al siguiente comprendido respectivamente en cada punta del peine.

25 El dispositivo puede comprender además un sistema de tubería para la infusión de la composición.

La composición administrada comprende un agente biológicamente activo, preferentemente un ácido nucleico terapéutico o profiláctico, o una composición como se ha descrito anteriormente en la solicitud.

30 La administración se puede llevar a cabo *in vivo*. A menudo puede resultar útil utilizar unos productos intermedios que puedan asegurar la continuidad eléctrica con un(os) electrodo (s) externos no invasivos. Pueden ser por ejemplo unos electrolitos como los utilizados para preparar una composición como se describe en la presente memoria y se ha mencionado anteriormente.

35 La presente invención da a conocer un dispositivo que se puede utilizar *in vivo* en particular en terapia génica.

AGENTE FARMACOLÓGICAMENTE ACTIVO

40 La presente invención se refiere al descubrimiento de que la administración en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar (y/o en el tejido o células del músculo extraocular), proporciona un mecanismo para el suministro de un agente farmacológicamente activo en el/los tejido(s) o células oculares.

45 Estos agentes pueden ser naturales o como no naturales. Una molécula no natural puede ser por ejemplo una molécula artificial, sintética, quimérica o truncada.

50 Tal como se utiliza en la presente memoria, una molécula natural puede estar "sustancialmente purificada", si se desea, de forma que una o más moléculas que están o pueden estar presentes en una preparación natural que contiene dicha molécula se hayan extraído o están presentes a una concentración más baja de la que normalmente se encontrarían.

55 Los productos terapéuticos o los agentes farmacológicamente activos, como se utilizan en la presente memoria, comprenden moléculas orgánicas biológicamente activas, seleccionadas por ejemplo de entre moléculas de ácido nucleico, proteínas y cualquiera de sus derivados o partes. Estos agentes pueden tener origen artificial o sintético (principalmente biosintético), o ser extraídos de un virus (por ejemplo, AAV o ADV) o de un organismo unicelular o pluricelular eucariota o procariota. Pueden ser, por ejemplo, de origen humano, otro mamífero, planta, origen vírico o bacteriano o pueden ser sus derivados que conserven el efecto biológico deseado.

60 Los agentes indicados en la presente memoria son preferentemente "biológicamente activos" en relación tanto a una característica estructural, como la capacidad de un ácido nucleico de hibridar a otra molécula de ácido nucleico, o la capacidad de una proteína de unirse mediante un anticuerpo (o de para competir con otra molécula para esta unión). Alternativamente, dicha característica puede ser catalítica, e implicar por lo tanto la capacidad del agente de regular, mediar o inducir una reacción o respuesta biológica o química, tanto profiláctica como terapéutica.

65 El término "derivado", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la modificación química de una secuencia de polipéptido o polinucleótido.

Las modificaciones químicas de una secuencia de polinucleótido pueden incluir, por ejemplo, la sustitución de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Un polinucleótido derivado codifica para un polipéptido que mantiene por lo menos una función biológica de la molécula natural. Un polipéptido derivado es un polipéptido modificado, por ejemplo mediante glicosilación o cualquier otro procedimiento, que mantiene por lo menos una función biológica del polipéptido del que se ha obtenido.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "gen" o "gen recombinante" se refiere a un ácido nucleico que comprende un marco de lectura abierta que codifica para un agente biológicamente activo, incluyendo secuencias exón y (opcionalmente) intrón.

Un agente farmacológicamente activo especialmente preferido, es decir, un agente terapéutico o profiláctico, es un ácido nucleico.

El ácido nucleico que se utiliza puede ser un ácido nucleico de interés, es decir, que presente una propiedad biológica como se ha descrito anteriormente. Más especialmente, el ácido nucleico puede ser, como se ha expuesto anteriormente, un ácido nucleico que codifique para un producto natural, truncado, artificial, quimérico o recombinante [por ejemplo, un polipéptido de interés (incluyendo una proteína o un péptido), un ARN, etc.] que presente una actividad biológica.

El ácido nucleico es preferentemente una molécula de ácido desoxribonucleico (ADN) (ADNc, ADNg, ADN sintético, ADN artificial, ADN recombinante, etc.) o una molécula de ácido ribonucleico (ARN) (ARNm, ARNt, ARNi, ARNsi, ARN catalítico, ARN antisentido, ARN viral, etc.). El ácido nucleico puede ser un ácido nucleico monocatenario o bicatenario, preferentemente un ácido nucleico bicatenario o puede ser complejo. El ácido nucleico puede comprender secuencias híbridas, secuencias sintéticas o semisintéticas. Se puede obtener mediante una de las técnicas conocidas por los expertos en la materia, y especialmente mediante bibliotecas de cribado, mediante síntesis química, o alternativamente mediante la mezcla de procedimientos que incluyen la modificación química o enzimática de secuencias obtenidas mediante las bibliotecas de cribado.

En una forma de realización particular, el ácido nucleico terapéutico es de origen sintético o biosintético, o extraído de un virus o de un organismo unicelular o pluricelular eucariota o procariota.

El ácido nucleico terapéutico utilizado en la presente invención puede ser desnudo, puede formar un complejo con un agente químico, bioquímico o biológico, puede estar insertado en un vector, etc., cuando se administra en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el tejido o células del músculo extraocular.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ADN desnudo" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que no está combinada con un agente sintético, biosintético, químico, bioquímico o biológico para mejorar la liberación o transferencia de dicho ADN, o para facilitar su entrada a la célula.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. El término se refiere también en la presente solicitud a un vehículo de liberación, como una composición asociada a un ácido nucleico terapéutico o profiláctico para aumentar su liberación celular.

Los vectores preferidos son los que pueden replicar y/o expresar de manera autónoma los ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores que pueden dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente se denominan en el presente documento "vectores de expresión". Generalmente, los vectores de expresión que son útiles en las técnicas de ADN recombinante se presentan frecuentemente en forma de "plásmidos" que se refieren a círculos de ADN circular bicatenario que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma. En la presente invención, el plásmido es la forma de vector utilizado más habitualmente. Según la invención, el plásmido es una forma preferida de de ADN desnudo.

Los vectores también pueden ser ADN episomal, cromosomas artificiales de levadura, microcromosomas o vectores virales en los que el vector viral se selecciona de entre el grupo constituido por lentivirus, adenovirus, virus adeno-asociado y un vector parecido a un virus.

El vector también puede ser una vesícula lipídica como un liposoma. También se pueden utilizar los compuestos basados en lípidos que no son liposomas. Por ejemplo, las lipofectinas y citofectinas son iones positivos con una base de lípidos que se unen al ácido nucleico cargado negativamente y forman un complejo que puede transportar el ADN a través de la membrana celular. La presente invención pretende incluir estas otras formas de vectores de expresión que cumplen funciones equivalentes y que posteriormente serán conocidos en la técnica.

Además, el ácido nucleico según la invención también puede contener una o más regiones adicionales, por ejemplo, elementos de regulación de tamaño pequeño o grande que están disponibles para los expertos en la técnica como una región promotora (constituyente, regulada, inducible, específica de tejido, etc.), por ejemplo las secuencias que permiten y/o promuevan la expresión en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el las células o tejido del

músculo extraocular, una señal de terminación de la transcripción, unas secuencias de secreción, unas secuencias de señales de replicación y/o localización nuclear (nls) que además aumentan la transferencia de polinucleótidos al núcleo celular. Estas secuencias nls se han descrito en la bibliografía, incluyendo la secuencia T grande del antígeno SV40 [Dingwall and Laskey, Trends Biochem. Sci. 16 (1991) 478; Kalderon *et al.*, Nature 311 (1984) 33].

Adicionalmente, el ácido nucleico puede además comprender unos marcadores selectivos útiles para la selección, la medida y la monitorización de los resultados de la transferencia del ácido nucleico (transferencia a qué tejidos, duración de la expresión, etc.). Los tipos de sistemas de expresión y genes trazadores que se pueden utilizar o adaptar para su utilización son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se utilizan normalmente los genes que codifican para la actividad de la luciferasa, la actividad de la fosfatasa alcalina, o la actividad de la proteína verde fluorescente. Ver Ausubel *et al.* [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), y suplementos hasta Mayo de 1999].

El ácido nucleico según la invención puede contener una secuencia de nucleótidos de cualquier tamaño. Por lo tanto, el ácido nucleico puede variar de tamaño desde un simple oligonucleótido a una molécula grande como una secuencia de nucleótidos que incluye exones y/o intrones y/o elementos reguladores de cualquier tamaño (pequeño o grande), un gen de cualquier tamaño, por ejemplo, de tamaño grande, o un cromosoma por ejemplo, y puede ser un plásmido, un episoma, un genoma viral, un fago, un cromosoma artificial de levadura, un microsoma, una molécula antisentido, etc.

En una forma de realización especialmente preferida, el polinucleótido es un ADN circular bicatenario, como un plásmido, que codifica para un producto con actividad biológica.

El ácido nucleico se puede preparar y producir según las técnicas de recombinación del ADN convencionales, como amplificación, cultivos de células huésped procariotas y eucariotas, purificación, etc. Las técnicas de la tecnología del ADN recombinante son conocidas por los expertos en la materia. Los procedimientos generales para la clonación y la expresión de moléculas recombinantes se describen en Maniatis *et al.* (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratories, 1982), y en Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley and Sons, 1987), que se incorporan como referencia.

Una sustancia biológicamente activa preferida es una sustancia activa ocular, es decir, una sustancia que puede ejercer un efecto beneficioso sobre las células oculares. Puede ser una sustancia que puede compensar una deficiencia o de reducir un exceso de una sustancia endógena. Alternativamente, puede ser una sustancia que confiera nuevas propiedades a las células. Puede ser, por ejemplo, una secuencia antisentido o un polipéptido que puede afectar a la función, morfología, actividad y/o metabolismo de las células oculares.

La disminución de la regulación de la expresión génica que utiliza ácidos nucleicos antisentido se puede conseguir a nivel de traducción o de transcripción. Los ácidos nucleicos antisentido de la invención son preferentemente fragmentos de ácido nucleico que pueden hibridar específicamente con un ácido nucleico que codifica para una sustancia endógena ocular activa o el ARN mensajero correspondiente. Estos ácidos nucleicos antisentido pueden ser oligonucleótidos sintéticos, opcionalmente modificados para mejorar su estabilidad y su selectividad. También pueden ser secuencias de ADN cuya expresión en las células produce ARN complementario a todo o a una parte del ARNm que codifica para una sustancia endógena ocular activa. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden preparar mediante la expresión de todo o una parte del ácido nucleico que codifica para una sustancia endógena ocular activa, en la orientación opuesta. Cualquier longitud de secuencia antisentido es adecuada para la práctica de la invención siempre y cuando pueda disminuir la regulación o bloquear la expresión de la sustancia endógena ocular activa. Preferentemente, la secuencia antisentido presenta por lo menos una longitud de 20 nucleótidos. La preparación y la utilización de los ácidos nucleicos antisentido, ADN que codifica para ARNs antisentido y la utilización de oligos y genética antisentido se da a conocer en el documento WO92/15680, cuyo contenido se incorpora en la presente memoria como referencia.

Entre los polipéptidos o proteínas biológicamente activos expresados opcionalmente por un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente o utilizables como un agente biológicamente activo y adecuados para la práctica de la invención son las enzimas, los derivados sanguíneos, las hormonas, las linfoquinas, las citocinas, las quimiocinas, los factores antiinflamatorios, los factores de crecimiento, los factores tróficos, los factores neurotróficos, los factores hematopoyéticos, los factores angiogénicos, los factores antiangiogénicos, los inhibidores de la metaloproteinasas, los reguladores de la apoptosis, los factores de coagulación, sus receptores, especialmente los receptores solubles, un péptido que sea un agonista o antagonista de un receptor o de una proteína de adhesión, los antígenos, los anticuerpos, sus fragmentos o derivados y otros constituyentes esenciales de la célula.

Varios factores neurotróficos derivados de la retina presentan el potencial de recuperar las células fotorreceptoras que se degeneran (Li and Turner, 1988a, b; Li *et al.*, 1991; Anchan *et al.*, 1991; Sheedlo *et al.*, 1989, 1993; Guillemot and Cepko, 1992; Steele *et al.*, 1993) y se pueden liberar mediante un procedimiento según la presente invención.

Los agentes biológicamente activos preferidos se pueden seleccionar de entre VEGF, angiogenina, angiopoyetina-1, Del-1, factores de crecimiento para díbroblastos ácidos o básicos (aFGF y bFGF), FGF-2, Folistatina, factor

estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de dispersión (SF), leptina, lidkina, factor de crecimiento placentario (PGF), factor de crecimiento de las células endoteliales derivadas de las plaquetas (PD-ECGF), factor-BB de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-BB), pleiotrofina ((PTN), progranulina, proliferina, factor transformador de crecimiento alfa (TGF-alfa), factor transformador de crecimiento beta (TGF-beta), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de permeabilidad vascular (VPF), CNTF, BDNF, GDNF, PEDF, NT3, BFGF, angiopoyetina, efrina, EPO, NGF, IGF, GMF, aFGF, NT5, Gax, una hormona de crecimiento, alfa 1-antitripsina, calcitonina, leptina, una apolipoproteína, una enzima para la biosíntesis de vitaminas, hormonas o neuromediadores, quimiocinas, citocinas como IL-1, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, un receptor suyo, un anticuerpo que bloquee uno de estos anticuerpos, TIMP como TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4, angio arrestina, endostatina como la endostatina XVIII y endostatina XV, ATF, angiostatina, una proteína de fusión de la endostatina y la angiostatina, una proteína de fusión de endostatina y angioestatina, el dominio hemopexina C-terminal de la metaloproteínasa-2, el dominio 5 kringle del plasminógeno humano, una proteína de fusión de endostatina y el dominio 5 kringle del plasminógeno humano, el inhibidor de la ribonucleada placentaria, el inhibidor del activador de plasminógeno, el factor plaquetario 4 (PF4), un fragmento de prolactina, una proteína relacionada con la proliferia (PRP), la antitrombina antiangiogénica III, el inhibidor derivado del Cartílago (CDI), un fragmento del complemento CD59, vasoestatina (fragmento calreticulina), trombospondina, fibronectina, en particular un fragmento fibronectina gro-beta, una heparinasa, una gonadotropina coriónica humana (hCG), interferón alfa/beta/gamma, proteína inducible por interferón (IP-10), la monoquina inducida por interferón gamma (Mig), proteína inducible por interferón alfa 10 (IP-10), una proteína de fusión Mig e IP10, receptor Tiroquinasa 1 similar a FMs soluble (FLT-1), receptor del dominio insertado quinasa (KDR), reguladores de la apoptosis como Bcl-2, Bad, Bak, Bax, Bik, isoforma corta de Bcl-X y Gax, fragmentos o sus derivados y similares

En una forma de realización especialmente preferida, el ácido nucleico codifica para un fragmento soluble del receptor TNF α , del receptor TGF β 2, del VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, CCR2 ó MIP1.

El ácido nucleico también puede, en otra forma de realización preferida, codificar para un anticuerpo, un fragmento variable de un anticuerpo de cadena simple (ScFv) u otro fragmento de anticuerpo que presenta capacidades de reconocimiento para la inmunoterapia.

En una forma de realización especial de la presente invención, el ácido nucleico biológicamente activo codifica para un precursor de una proteína terapéutica utilizable en la presente invención como las descritas anteriormente.

Además, en otra forma de realización de la presente invención, se puede utilizar una mezcla de ácidos nucleicos que codifican para distintos productos biológicamente activos. Esta variante permite la coexpresión de diferentes productos en las células oculares.

Las formas esenciales de liberar ácidos nucleicos incluyen la transferencia genética *in vivo* y la transferencia genética *ex vivo*. La transferencia genética *in vivo* como se describe en la presente memoria implica la introducción del ácido nucleico específicamente en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar (y/o, posiblemente, en el tejido o células del músculo extraocular) del paciente utilizando un ácido nucleico desnudo, un ácido nucleico que forma un complejo, vectores de ácidos nucleicos, etc., como se ha descrito anteriormente. Se pueden utilizar las dos amplias categorías indicadas anteriormente para conseguir la transferencia genética. En la transferencia genética *ex vivo* según la presente memoria, una célula, especialmente las células musculares, preferentemente las células de los músculos lisos, todavía más preferentemente las células de el/los tejido(s) del cuerpo ciliar y/o del músculo extraocular, se extraen del paciente y se cultivan en un medio de cultivo. El ácido nucleico se transfiere a dichas células, y preferentemente se aumenta el número de células transfectadas y después se reimplantan en el paciente, preferentemente en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el tejido o células del músculo extraocular. Una célula especialmente útil en la transferencia *ex vivo* como se describe en el presente documento puede ser una célula de fibroblasto por ejemplo. Otro producto biológicamente activo como se describe en la presente memoria es por lo tanto una célula transfectada con un ácido nucleico de interés como el descrito anteriormente o una célula que expresa dicho ácido nucleico.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

En un aspecto, la presente memoria se refiere a la utilización de un agente biológicamente activo, como un ácido nucleico terapéutico o profiláctico, para la preparación de una composición para el tratamiento o la prevención de una enfermedad ocular mediante la administración de dicha composición en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar (y/o en el tejido o células del músculo extraocular) del sujeto que se debe tratar, en la que el agente biológicamente activo está presente en una composición que contiene, además, un excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La composición farmacéutica para la prevención o el tratamiento de una enfermedad ocular también se da a conocer. Dicha composición se destina a la administración en los tejidos o células del cuerpo ciliar y/o en las células o tejido del músculo extraocular y comprende un agente biológicamente activo y preferentemente un excipiente o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

La preparación o composición farmacéutica que se describe en la presente memoria puede estar esencialmente constituida por el biológicamente activo, preferentemente un ácido nucleico desnudo, un ácido nucleico que forma un complejo, un vector de un ácido nucleico o un sistema de suministro, etc., en un vehículo, excipiente o diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que el ácido está embebido. Alternativamente, cuando se puede producir un sistema completo de suministro del ácido nucleico intacto de las células recombinantes, por ejemplo, vectores plásmidos, la preparación farmacéutica puede comprender una o más células, preferentemente células del cuerpo ciliar y/o células musculares extraoculares, que producen la proteína terapéutica secretada.

Un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente compatible o fisiológicamente aceptable incluye diluyentes y aglutinantes que son farmacéuticamente aceptables para procedimientos de administración, que son estériles, y se pueden seleccionar de entre solución salina tamponada, neutra o ligeramente ácida (que incluye fosfatos, cloruros, etc.), soluciones o suspensiones acuosas u oleaginosas y más preferentemente de entre sacarosa, trehalosa, surfactantes, proteínas y aminoácidos. El vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente compatible o fisiológicamente aceptable se formula preferentemente utilizando un agente dispersante, humectante, suspensor, calmante, isotónico o un agente viscosante adecuado, estabilizantes, conservantes y un tampón adecuado para formar una solución isotónica. El vehículo farmacéuticamente aceptable particular y la proporción de compuesto activo en el vehículo se determinan por la solubilidad y las propiedades químicas de la composición, el modo de administración en particular, y la práctica farmacéutica estándar. Los expertos en la materia sabrán cómo formular estos vehículos mediante las técnicas conocidas.

Un ejemplo de estabilizante es el edetato disódico o similares. Los ejemplos de agentes isotónicos son la glicerina, el propilenglicol, el polietilenglicol, el cloruro sódico, el cloruro potásico, el sorbitol y el manitol o similares. Los ejemplos de tampones son el ácido cítrico, el hidrogenofosfato sódico, el ácido acético glacial y el trometamol o similares. Los ejemplos de agentes para ajustar el pH son el ácido clorhídrico, el ácido cítrico, el ácido fosfórico, el ácido acético, el hidróxido sódico, el carbonato sódico y el hidrogenocarbonato sódico o similares. Los ejemplos de agentes calmantes son el alcohol bencílico o similares. Los ejemplos de conservantes son el cloruro de benzalconio, el cloruro de bencetonio, ésteres p-hidroxibenzoato, benzoato de sodio y clorobutanol o similares.

Puede ser deseable una viscosidad superior a la de una simple solución acuosa para aumentar la absorción ocular del compuesto activo, para disminuir la variabilidad en la administración de las formulaciones, para disminuir la separación física de los componentes de una suspensión o emulsión de la formulación y/o además mejorar la formulación oftalmológica. Dichos agentes viscosantes incluyen, por ejemplo, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa u otros agentes conocidos por los expertos en la técnica. Estos agentes se utilizan normalmente a un nivel desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 2% en peso.

Las formas de las preparaciones de la composición farmacéutica, como se describe en la presente memoria, destinadas para la administración en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el tejido o células o músculo extraoculares, son preferentemente preparaciones líquidas.

Las preparaciones líquidas se pueden preparar, por ejemplo, mediante la disolución del agente biológicamente activo en BBS (Solución Salina tamponada), una solución de glicerina, una solución de ácido hialurónico y similares. Una composición en particular comprende, por ejemplo, BBS (60%) y ácido hialurónico (40%). Opcionalmente, se pueden añadir a las preparaciones líquidas un estabilizante, un agente isotónico, un tampón, un agente para ajustar el pH, un agente calmante, un conservante, electrolitos, como sodio, potasio, calcio, magnesio y/o cloruro o similares en una cantidad adecuada.

Los procedimientos para la formulación y administración de ADN desnudo en tejidos musculares de mamíferos se dan a conocer en las patentes US nº 5.580.859 y nº 5.589.466.

La composición farmacéutica puede comprender, o el agente biológicamente activo se puede combinar (en una utilización según la presente invención) con, un principio o adyuvante activo adicional. El adyuvante se puede seleccionar de entre una sustancia, una mezcla, un soluto o una composición que facilite o aumente la actividad biológica del agente terapéutico o profiláctico como cualquier agente biológico, sintético o biosintético que mejore el suministro o la transferencia de dicho agente y que pueda ser asimilado por un vector (como un vehículo de liberación) según la presente exposición. El adyuvante se puede acondicionar y administrar separadamente del o secuencialmente con el agente terapéutico o profiláctico que contiene la composición y/o en un sitio distinto de inyección. El tratamiento con agentes múltiples y/o adyuvantes según la presente exposición se debe realizar utilizando una mezcla de agentes y/o adyuvantes pero se puede realizar utilizando preparaciones farmacéuticas separadas. Es necesario que las preparaciones se suministren en el mismo momento exacto, pero se pueden coordinar para que se suministren al paciente durante el mismo periodo de tratamiento, es decir, en el espacio de una semana o un mes de cada uno.

Un agente terapéutico adecuado se puede coordinar con las composiciones de la presente invención. Los ejemplos no limitativos de agentes terapéuticos que se pueden administrar además del agente biológicamente activo anterior

(profiláctico o terapéutico) mediante un procedimiento según la presente invención también incluyen agentes permeabilizantes como un virus, una vesícula lipídica, ácido hialurónico, iones positivos basados en lípidos, emulsiones policatiónicas, péptidos catiónicos, políplex, etc.; antibióticos y agentes antimicrobianos como clorhidrato de tetraciclina, leucomicina, penicilina, derivados de la penicilina, eritromicina, sulfatiazol y nitrofurazona; anestésicos locales como benzocaína; vasoconstrictores como clorhidrato de fenilefrina, clorhidrato de tetrahidrozolina, nitrato de nafazolina, clorhidrato de oximetazolina e clorhidrato de tramazolina; cardiotónicos como digitalis y digoxina; vasodilatadores como nitroglicerina e clorhidrato de papaverina; antisépticos como clorhidrato de clorhexidina, hexilresorcinol, cloruro de decualinio y etacridina; enzimas como cloruro de lisozoma y dextranasa; hipotensores; sedantes; agentes antitumorales; agentes antiinflamatorios esteroides como hidrocortisona, prednisona, fluticasona, prednisolona, triamcinolona acetónido, dexametasona, betametasona, beclometasona y dipropionato de beclometasona; agentes antiinflamatorios no esteroideos como acetaminofeno, aspirina, aminopirina, fenilbutazona, ácido mefanámico, ibuprofeno, diclofenaco sódico, indometacina, colchicina y probenocid; agentes antiinflamatorios enzimáticos como quimotripsina y seratiopeptidasa bromelaina; agentes antihistamínicos como clorhidrato de difenidramina, maleato de clorofeniramina y clemastina; agentes antialérgicos; y compuestos analgésicos.

Los niveles concretos de dosificación de los principios activos en las composiciones que se dan a conocer en la presente memoria se pueden adaptar para obtener una cantidad de principio activo que sea eficaz para obtener una actividad biológica deseada.

Debe apreciarse, sin embargo, que el nivel de dosificación específico para un paciente en particular dependerá de una variedad de factores que incluyen el peso, el estado de salud, el sexo, la dieta, el tiempo, las velocidades de absorción y excreción, la combinación con otros fármacos y la gravedad de la enfermedad en particular que se debe tratar.

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en una unidad de dosificación y se pueden preparar mediante un procedimiento conocido en la técnica farmacéutica. Todos los procedimientos incluyen la etapa de llevar al agente activo a asociarse con un vehículo como el descrito anteriormente que constituye uno o más ingredientes adicionales. Por lo general, las composiciones se preparan llevando de forma uniforme y concreta el agente activo a una asociación con un vehículo, preferentemente un vehículo líquido.

Otros sistemas de suministro pueden incluir sistemas de suministro de liberación prolongada, de liberación retardada o de liberación sostenida. Estos sistemas pueden evitar, si es necesario, las administraciones repetidas del agente activo, lo que mejora la conveniencia del sujeto y del médico. Muchos tipos de sistemas de suministro de liberación están disponibles y son conocidos por los expertos en la materia. Incluyen sistemas basados en polímeros como poli(láctido-glicólido), copolioxalatos, policaprolactonas, poliestramidas, poliortoésteres, ácido polihidroxibutírico y polianhídridos. Los sistemas de suministro también incluyen sistemas no poliméricos que son: lípidos que incluyen esteroides como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras como mono-, di- y triglicéridos; sistemas de liberación con hidrogeles; sistemas silásticos; sistemas basados en péptidos; recubrimientos de cera y similares.

Otra forma de realización de la presente invención se refiere a la utilización de un agente biológicamente activo como el descrito anteriormente, preferentemente de un ácido nucleico terapéutico, para la preparación de una composición farmacéutica como la descrita anteriormente para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad ocular en un sujeto mediante la administración de dicha composición en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el tejido o células del músculo extraocular del sujeto en tratamiento.

TRATAMIENTO

En la presente memoria se da a conocer un procedimiento para el suministro *in vivo* de un agente biológicamente o farmacológicamente activo como el descrito anteriormente en la presente memoria, especialmente un ácido nucleico terapéutico o profiláctico, o una composición como la descrita anteriormente en la presente memoria, en la esfera ocular de un sujeto, en particular en la parte interna o posterior del ojo, que comprende la administración de dicho agente o composición en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar (y/o en el tejido o células del músculo extraocular).

En la presente memoria también se da a conocer un procedimiento para la producción de una proteína terapéutica o profiláctica en el/los tejido(s) o células oculares de un sujeto que comprende la administración en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el tejido o células del músculo extraocular de un ácido nucleico que codifica para dicha proteína, en el que dicho ácido nucleico se libera en dicho tejido(s) o células oculares y se expresa tal como se ha explicado anteriormente.

También se da a conocer un procedimiento para la protección de un sujeto contra una enfermedad o incapacidad ocular que comprende la administración de un agente biológicamente o farmacológicamente activo tal como se ha descrito en la presente memoria anteriormente, preferentemente un ácido nucleico, o una composición como la descrita en la presente memoria anteriormente, en particular en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar, y/o en el tejido o células del músculo extraocular, en el que dicho agente o composición se suministra en el/los tejido(s) o

células oculares y protege contra las enfermedades oculares.

También se da a conocer un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad o incapacidad ocular que afecte a un sujeto que comprende la administración al sujeto de un agente biológicamente o farmacéuticamente activo como el descrito anteriormente, preferentemente un ácido nucleico que codifica para una sustancia terapéutica, o una composición como la descrita anteriormente en el presente documento, en particular en el cuerpo ciliar (músculo o epitelio), y/o el músculo extraocular, en el que dicho agente o composición se libera en el/los tejido(s) o células oculares incapacitados.

Otro aspecto del documento se refiere a la terapia génica. Este tipo de terapia consiste en la introducción de un ácido nucleico en una célula o tejido *in vivo* o *ex vivo*. En algunos casos, el ácido nucleico tiene como objetivo sustituir (o actuar en su lugar) o corregir un gen endógeno funcionalmente deficiente, para proporcionar al huésped la capacidad de producir un polipéptido terapéutico, para provocar la represión de un producto genético no deseado, o para estimular una respuesta inmunológica.

En un aspecto en particular, el procedimiento terapéutico comprende la administración de un ácido nucleico, preferentemente un oligonucleótido quimérico como el descrito anteriormente, que puede revertir o inducir una mutación en un gen diana o en unas células diana, cuya expresión genética está asociada a esa enfermedad, en un sujeto huésped que necesite ese tratamiento, en el que el procedimiento utilizado para la liberación *in vivo* de dicho ácido nucleico en dichas células diana es el procedimiento para la liberación *in vivo* de un ácido nucleico según la presente invención.

En un aspecto en particular, el procedimiento para la liberación *in vivo* de un ácido nucleico en las células oculares como el descrito anteriormente en la presente memoria se utiliza para tratar o prevenir una enfermedad genética ocular debida a la presencia de por lo menos una mutación en un gen de las células oculares, un gen mutado cuya expresión es la responsable de dicha enfermedad ocular. En este procedimiento, dicho ácido nucleico es complementario a una secuencia de un fragmento de ADN genómico del gen diana mutado de dichas células con la excepción de la mutación que se desea revertir en dicho gen diana mutado.

En otro aspecto, el procedimiento para la liberación *in vivo* de un ácido nucleico en las células oculares se utiliza para inducir voluntariamente una mutación en un gen en esas células oculares de un animal, un gen mutado cuya expresión es la responsable de la enfermedad ocular, para obtener un tejido u organismo animal o humano que puede servir como modelo para el estudio de dicha enfermedad ocular o para el cribado de compuestos que puedan tratar esa enfermedad ocular.

Los sujetos que se pueden beneficiar de los procedimientos terapéuticos o profilácticos descritos anteriormente pueden ser un animal, especialmente un mamífero, preferentemente un humano que padezca una enfermedad o una anomalía ocular que requiera un tratamiento con un fármaco ocular, una proteína o un péptido.

La presente exposición se refiere, por lo tanto, a la utilización de dicho procedimiento para prevenir o tratar varias enfermedades o discapacidades oculares, que comprende de manera no limitativa las enfermedades oculares inflamatorias, enfermedades isquémicas, enfermedades proliferativas (por ejemplo, una enfermedad neovascular o glial), enfermedades neurodegenerativas y glaucoma, tanto por separado como en combinación con tratamientos adicionales.

EJEMPLOS DE ENFERMEDADES OCULARES QUE SE PUEDEN TRATAR UTILIZANDO LA PRESENTE INVENCION

Los ejemplos no limitativos de enfermedades y trastornos oculares que se pueden tratar mediante los distintos procedimientos descritos en la presente memoria incluyen enfermedades oculares proliferativas, enfermedades oculares neurodegenerativas, glaucoma, enfermedades oculares infecciosas, enfermedades oculares inflamatorias (como conjuntivitis, queratitis, endotelitis, uveítis, coroiditis, retinitis, retinocoroiditis, uveítis anterior y neuropatías ópticas inflamatorias), degeneraciones de la retina, (especialmente retinitis pigmentosa, degeneración periférica de la retina, degeneración macular como la degeneración macular seca relacionada con la edad), retinopatía isquémica (especialmente retinopatía de prematuridad y retinopatía diabética), enfermedades vasculares de la retina, síndrome isquémico ocular y otras anomalías vasculares, trastornos y tumores coroidales, trastornos del cuerpo vítreo, proliferación glial como la retinopatía vítrea proliferativa y la proliferación glial asociada a la angiogénesis diabética prerretiniana, etc.

Las enfermedades más importantes que se pueden prevenir o tratar se describen a continuación:

La inflamación intraocular comprende todos los tipos de inflamación de los tejidos intraoculares, principalmente la úvea y la retina. Las inflamaciones intraoculares pueden ser debidas a causas inmunológicas, causas infecciosas, causas iatrogénicas o a etiologías desconocidas. Pueden ser agudas, recurrentes o crónicas. Las inflamaciones intraoculares están entre las causas más frecuentes de ceguera curable. Las inflamaciones intraoculares del segmento posterior pueden estar asociadas a la vasculitis, la neuritis óptica, la vitritis y la retinitis por corea.

Las distrofias hereditarias de la retina o la retinitis pigmentosa son enfermedades hereditarias que causan la ceguera debido a mutaciones o deleciones en el gen implicado en el ciclo visual. Comienzan a una edad temprana y progresan lentamente hasta una ceguera total. La pérdida de fotorreceptores está asociada a la pérdida de los pigmentos de la retina y a la atrofia vascular y del nervio óptico en las etapas posteriores. Algunas de estas degeneraciones hereditarias son debidas a una mutación del ADN mitocondrial.

Existen dos tipos principales de glaucoma: glaucoma crónico o glaucoma de ángulo abierto (POAG) y glaucoma agudo de ángulo cerrado. Otras variaciones incluyen el glaucoma congénito, el glaucoma pigmentario, el glaucoma neurovascular y el glaucoma secundario. El glaucoma es similar a una hipertensión ocular pero acompañada de lesiones en el nervio óptico y pérdida de visión. El glaucoma se trata normalmente con gotas para los ojos, láser, o una cirugía ocular convencional. Si no se trata, el glaucoma puede provocar ceguera.

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos capilares que conduce a la neovascularización. La angiogénesis es un proceso complejo que incluye una serie de etapas secuenciales que incluyen la degradación de la membrana endotelial por células endoteliales de la membrana vascular basal y las matrices intersticiales, la migración de las células endoteliales, la proliferación de las células endoteliales y la formación de lazos capilares por las células endoteliales. Aunque la angiogénesis es un proceso normal para el desarrollo o el mantenimiento del sistema vascular, la aparición de situaciones patológicas (es decir, enfermedades dependientes de la angiogénesis) en el lugar en el que los vasos sanguíneos crecen son en realidad dañinas. La angiogénesis está muy asociada a importantes enfermedades del tejido ocular, incluyendo las retinopatías diabéticas, la degeneración macular asociada a la edad, la retinopatía del prematuro, el rechazo del injerto corneal, el glaucoma neurovascular y el rasgado de la cornea. Cualquier crecimiento anormal de vasos sanguíneos en el ojo puede dispersar o bloquear la incidencia de luz antes de que llegue a la retina. La neovascularización puede darse prácticamente en cualquier parte del ojo y alterar significativamente la función del tejido ocular. Algunas de las enfermedades neurovasculares oculares más nocivas son las que implican a la retina. Por ejemplo, muchos pacientes diabéticos desarrollan una retinopatía que se caracteriza por la formación de nuevos vasos sanguíneos con derrame en la superficie anterior de la retina y en el cuerpo vítreo provocando una vitreo-retinopatía proliferativa. Un subconjunto de pacientes con degeneración macular asociada a la edad desarrollan una neovascularización subretiniana que conduce finalmente a la ceguera.

La retinopatía diabética ocurre cuando los vasos sanguíneos de la retina dentro del ojo derraman sangre y fluidos en el tejido colindante. Aproximadamente un 80% de los pacientes diabéticos desarrollan la retinopatía diabética. Esta enfermedad se trata normalmente utilizando un láser. Sin embargo, la terapia con láser implica complicaciones que incluyen la oclusión de la vena de la retina, pérdida de agudeza visual, hemorragia en el cuerpo vítreo y algunas veces no funciona. Si no se trata, la retinopatía diabética puede provocar ceguera.

La retinopatía del prematuro (ROP) afecta a los bebés prematuros. Consiste en un crecimiento anormal de los vasos sanguíneos en la retina y el cuerpo vítreo. La progresión a estados posteriores de la ROP puede conducir a la formación de cicatrices en el tejido de la retina, hemorragia del cuerpo vítreo y desprendimiento de la retina. El tratamiento se realiza normalmente mediante láser o crioterapia (congelación).

Las retinopatías isquémicas son retinopatías asociadas a la oclusión vascular (capilares o vasos grandes) que conducen a un daño neuroteriniano, muerte de las células y neoangiogénesis.

La degeneración macular es una enfermedad que afecta a la visión central y que conduce a la pérdida de la visión. Aunque existen tipos de deformación macular que afecta a las personas jóvenes, la enfermedad aparece normalmente en personas mayores de 60 años. Por lo tanto, esta enfermedad se denomina degeneración macular relacionada con la edad (AMD). Debido a que normalmente sólo resulta afectada la parte central de la visión de la persona, raramente se experimenta una ceguera debido a la enfermedad. Sin embargo, la lesión en la mácula en el centro de la retina puede destruir la visión central clara. Las formas secas se asocian a la degeneración de la neurorretina, las células RPE y la coroides. Las formas húmedas se asocian a los episodios descritos anteriormente y al crecimiento de los nuevos vasos de los coriocapilares y/o los vasos de la retina, desprendimiento y hemorragias subretinianas, hemorragias y lagrimeo subepitelial, etc. La degeneración macular ocurre normalmente después de los 60 años de edad. Aunque la visión central se reduce, la mayoría de los pacientes conservan parte de la visión y nunca acaban totalmente ciegos.

La queratitis es una inflamación de la córnea. La queratitis puede estar provocada por infecciones bacterianas, víricas o fungicas, la sequedad de los ojos como resultado de trastornos en el párpado o la disminución de la capacidad de formar lágrimas, la exposición a una luz muy brillante, objetos extraños que lesionan o se alojan en el ojo, la sensibilidad o reacciones alérgicas al maquillaje, el polvo, el polen, la polución u otros materiales irritantes y la deficiencia de vitamina A.

El fruncimiento (pucker) macular (también denominado membrana epirretiniana, arruga retinal, fibrosis premacular y maculopatía en celofán) es debido frecuentemente a la contracción del cuerpo vítreo que tira de la retina haciendo que la retina se agriete y se arrugue. Otras causas del fruncimiento macular incluyen traumatismo (debido a cirugía o

a lesiones oculares), desprendimiento de la retina, inflamación, y problemas con los vasos sanguíneos de la retina. El único tratamiento es la cirugía que consiste en una vitrectomía (extracción del cuerpo vítreo) combinada con una exfoliación del tejido agrietado. La complicación más habitual en la vitrectomía es un incremento de la tasa de desarrollo de las cataratas.

5 La enfermedad ocular tratada se puede seleccionar de entre escleritis, queratitis, endotelitis, uveítis, coroiditis, retinitis, retinocoroiditis, uveítis anterior, retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, retinopatía proliferativa del cuerpo vítreo, distrofias hereditarias de la retina, degeneración macular asociada a la edad, glaucoma de ángulo abierto, glaucoma neovascular, retinopatía isquémica, etc.

10 En la presente memoria se da a conocer un procedimiento para el tratamiento de la uveítis crónica que comprende la administración de un ácido nucleico que codifica para un receptor soluble de TNF alfa en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el tejido o células del músculo extraocular de un mamífero que presente esta enfermedad.

15 Además en la presente memoria se da a conocer un procedimiento para el tratamiento de la formación de nuevo de vasos intraoculares o edema macular que comprende la administración de un ácido nucleico que codifica para un receptor anti VEGF, un receptor de anti VEGF o un anti PLGF en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el tejido o células del músculo extraocular de un mamífero que presente esta enfermedad.

20 También se da a conocer en la presente memoria un procedimiento para tratar o retrasar la aparición de la retinitis pigmentosa que comprende la administración de un ácido nucleico que codifica para un anti IRS-1 o IGF-1 en el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o en el tejido o células del músculo extraocular de un mamífero que presente esta enfermedad.

25 En los procedimientos y utilidades que se describen en la presente memoria, el/los tejido(s) o células del cuerpo ciliar y/o el tejido o células del músculo extraocular se pueden someter a tratamiento para mejorar la transferencia del ácido nucleico antes, durante o después de dicha transferencia. Este tratamiento puede ser de naturaleza farmacéutica y en la forma de aplicación local o sistémica, o puede ser un tratamiento enzimático, permeabilizante, quirúrgico, mecánico, térmico o físico como los descritos anteriormente.

30 KITS

35 Según los procedimientos dados a conocer en la presente memoria, están previstos equipamientos para prevenir o tratar una enfermedad ocular. Los dispositivos y las composiciones según la presente invención se pueden suministrar conjuntamente en un kit. En el kit, los componentes pueden estar empaquetados por separado o conjuntamente. Otros componentes como excipientes, vehículos, otros fármacos o adyuvantes, instrucciones para la administración de la sustancia o composición activa y dispositivos para administración o para inyección se pueden proporcionar también con el equipo. Las instrucciones pueden estar en formato escrito, en un vídeo, o audio, pueden estar contenidas en papel, un soporte electrónico, o incluso como referencia a otra fuente, como una página web o un manual de referencia.

40 En particular, la invención proporciona un kit que contiene un plásmido liofilizado seco, un medio de disolución para dicho plásmido y un dispositivo de electrodo único como se ha descrito anteriormente.

45 Otros aspectos y ventajas de la presente invención se describirán en los ejemplos siguientes, ilustrativos y no limitativos del alcance de la presente invención.

PARTE EXPERIMENTAL

50 En la presente invención, se ha diseñado una nueva técnica de electrotransferencia para transfectar de forma específica particularmente músculos ciliares oculares. El plásmido que codifica tanto para la proteína fluorescente verde (GFP) como para luciferasa (luc) se ha utilizado para trazar y cuantificar la expresión genética postransfección. El potencial terapéutico de esta técnica se evalúa en ratas con uveítis inducida por endotoxina (EIU) utilizando un gen que codifica para receptores de TNF- α tip I solubles (hTNFR-Is).

55 Material y métodos

Animales:

60 Se utilizaron ratas Lewis hembras de 6 a 7 semanas de edad que pesaban 150 a 200 g (IFFA CREDO, Lyon, Francia). Los experimentos se realizaron según la anestesia ARVO mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital (40 mg/kg). Al final de los experimentos, las ratas se sacrificaron mediante una sobredosis de pentobarbital.

Plásmidos:

5 El pVAX2 consiste en un plásmido pVAX1 (Invitrogen) en el que el promotor se reemplaza por el promotor del plásmido pCMV β . El pCMV β (Clontech) se digirió con EcoRI, después se obtuvo el extremo romo mediante el fragmento Klenow, y finalmente se digirió mediante BamHI. Se purificaron los fragmentos de 629 bp resultantes correspondientes al promotor CMV después de la electroforesis con gel de azarosa. Este promotor se ligó al fragmento HincII –BamHI pVAX1 para conseguir el pVAX2.

10 pVAX2-luc es un vector de plásmido de 4,6 kb que codifica para una proteína de luciferasa de luciérnaga citosólica bajo el control del promotor CMV.

El plásmido pEGFP-C1 es un plásmido de 4,7 kb que presenta el gen de la proteína fluorescente verde bajo el control del promotor CMV (Clontech, Palo Alto, CA).

15 El plásmido pVAX2 hTNFR-Is/mIgG1 es un plásmido de 4,3 kb que codifica una proteína quimérica del receptor TNF- α tipo I soluble (hTNFR-Is) unido a la porción Fc de la inmunoglobulina G1 (Ig G1) clonado en un esqueleto de pVAX2. Esta proteína quimérica presenta una vida media superior al equivalente monomérico natural hTNFR-Is.

20 Electrotransferencia al músculo ciliar de la rata

25 Para los experimentos de electrotransferencia, el ojo resulta expuesto y se mantiene en posición utilizando una talla quirúrgica. La inyección intramuscular en el músculo ciliar se realizó en el cuadrante temporal superior utilizando una aguja 30G en una jeringuilla microfina de 100 μ l (Hamilton, España). Para alcanzar el músculo ciliar situado debajo de la esclerótica posterior al limbo, la inyección muscular intraciliar se realizó a través de una incisión tunelizada en la córnea. Cuando la aguja había atravesado el limbo, se insertó un poco más profundamente a una distancia de 1 mm y se inyectaron los plásmidos (diluidos en 10 μ l de solución salina x1). Después de la inyección se formó una pequeña ampolla subesclerótica (Figura 1A).

30 Para la electrotransferencia, un electrodo afilado (500 μ m de diámetro) de iridio/platino especialmente diseñado, desnudo en 2 mm y después cubierto con silicona el resto de su longitud, se insertó a través del túnel de la córnea y se conectó al cátodo. El ánodo de retorno del electrodo consistía en una lámina de platino de 0,3 mm de grosor, 5 mm de longitud y 2,5 mm de ancho, diseñado para encajar exactamente en la superficie de la esclerótica de la rata que recubre el cuerpo ciliar (Figura 1, Franja 1b).

35 El generador de electrotransferencia se colocó para suministrar una intensidad del campo eléctrico de 200 voltios/cm. Se administraron ocho impulsos consecutivos (180 ms entre los impulsos) de 10 voltios y 20 ms de duración cada uno utilizando el sistema descrito anteriormente. La intensidad del campo eléctrico no provocó ningún daño estructural o quemaduras en el tejido clínicamente detectables. (Figura 1C).

40 Diseño experimental:

Se utilizaron los plásmidos pVAX2-luc ó pEGFP-C1 para localizar y dosificar la prueba de concepto para la expresión de los genes trazadores en el músculo ciliar:

45 1. Se inyectaron tres μ g de plásmido pEGFP-C1, diluidos en 10 μ l de solución salina, en el músculo ciliar de 12 ojos (12 ratas). En 4 ojos (4 ratas) no se realizó ningún tratamiento adicional. En 8 ojos (8 ratas) la electrotransferencia se realizó inmediatamente después de la inyección descrita anteriormente.

50 Se utilizaron 4 ratas más (4 ojos) como grupo de control y recibieron 10 μ l de solución salina en el músculo ciliar del ojo derecho. En dos de estas ratas (2 ojos), a la inyección de solución salina le siguió la electrotransferencia. Todos los animales se examinaron los días 1 y 8 y se sacrificaron el día 8 mediante una sobredosis de pentobarbital. Los ojos tratados se enuclearon y se congelaron rápidamente. Se prepararon criosecciones (8 μ m de grosor) mediante histología de rutina y tinción inmunohistoquímica.

55 2. Se inyectaron tres μ g de pVAX2-luc, diluidos en 10 μ l de solución salina, en el músculo ciliar de ambos ojos de 24 ratas. A la inyección del plásmido le siguió la electrotransferencia en los ojos izquierdos de estas 24 ratas. En los días 6, 12, 22 y 30 después del tratamiento se sacrificaron seis de las ratas. En cada punto de corte, se diseccionaron los ojos, se extrajo totalmente el músculo ciliar y se congeló a una temperatura de -80°C y se utilizaron para la evaluación de actividad de luciferasa (luc). Se utilizaron cuatro ojos de dos ratas adicionales como control negativo para la expresión de la luc.

60

Histoquímica de la GFP e inmunohistoquímica de la actina del músculo liso α

65 El día 8 después de la electrotransferencia de pEGFP-C1, se enuclearon los ojos, se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 1 hora, se enjuagaron en PBS 1x, se embebieron en un compuesto OCT y se crioseccionaron (8 μ m). Se realizaron secciones transversales (8 μ m) en 3 ojos tratados con la electrotransferencia de pEGFP-C1, y en 2

ojos simplemente inyectados con pEGFP-C1 para obtener secciones transversales de las miofibras circulares del músculo ciliar. En los otros ojos, se realizaron secciones sagitales de 8 µm (paralelas al eje óptico). Para visualizar el núcleo celular, las secciones se tiñeron durante 5 minutos con una solución de 4',6-diamino-fenilindol (DAPI) diluida al 1/3000 (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, Francia), se levaron otra vez en PBS y se montaron en glicerol/PBS (1/1). Las secciones se examinaron en un microscopio de fluorescencia (Leica, Suiza) y se realizaron microfotografías digitales con un tiempo de exposición constante para todas las secciones.

Se realizó una tinción inmunofluorescente con el anticuerpo alfa actina de músculo liso monoclonal antihumano (anti- α -sm-1) de ratón (Chemicon, Temecula, CA) para localizar el músculo ciliar en las secciones transversal y frontal. Las secciones de tejido se fijaron durante 5 minutos con acetona a una temperatura de -20°C y se secaron al aire. La dilución de los sobrenadantes se realizó en PBS que contenía 3 mM de EGTA. Se utilizó el Anti- α -sm-1 a una concentración de 5 µg/ml. Como segundos anticuerpos, se utilizó una tinción Texas Red ® conjugada con IgG antirratón de burro AffinPure (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) diluido al 1:50. Los núcleos se tiñeron por incubación durante 5 minutos con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) diluido en solución 1/3000 (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, Francia). Las secciones se volvieron a lavar en PBS y se montaron en glicerol/PBS (1/1). Como grupo negativo se utilizó el suero pre-inmunológico de rata en lugar del anticuerpo primario.

Medición *in vitro* de la actividad de la luciferasa

Las ratas que recibieron la inyección ciliar de 3 µg pVAX2-luc en el ojo derecho y una inyección seguida de la electrotransferencia en los ojos izquierdos se sacrificaron los días 6, 12, 22 y 30 después del tratamiento. Los ojos se enuclearon y se diseccionaron bajo un microscopio binocular para cirugía, se extrajeron el cuerpo y el músculo ciliar y el complejo del iris, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C hasta que se realizó el ensayo. Después, cada muestra se homogeneizó en 0,3 ml de reactivo de lisis para cultivo en placa (Promega, Charbonnière, Francia) con un suplemento de una mezcla de inhibidor de la proteasa (Boehringer, Mannheim, Germany) (un comprimido para 50 ml). Después de una centrifugación de 10 minutos a 15000 g y a una temperatura de 4°C, se evaluó la actividad de la luciferasa en 10 µl de los sobrenadantes colocados en una placa blanca de 96 pocillos. El detector era un luminómetro Wallac Victor (EG&G Wallac, Evry, Francia) que añadía 50 µl de sustrato de ensayo de luciferasa (Promega) a la muestra e integra la luz producida por la muestra durante 10 segundos. Los resultados de toda la muestra se representan en ciclos por segundo (cps).

Efecto de la electrotransferencia del plásmido de hTNFR-Is/mlgG1:

La producción de hTNFR-Is en el humor acuoso y en el suero se evaluó al 7º día después de la inyección de pVAX2 hTNFR-Is/mlgG1 en el músculo ciliar con (o sin) electrotransferencia adicional. Para optimizar las condiciones experimentales para el muestreo en el humor acuoso, se inyectaron 30 µg de pVAX2 hTNFR-Is/mlgG1 (en 10 µl de solución salina) en el ojo derecho de 16 ratas, seguido de una electrotransferencia en 8 ojos de estas 16 ratas. En el día 6 del tratamiento, las ratas se sacrificaron. Se recogió una muestra del suero de estas 16 ratas. Se obtuvieron los humores acuosos de los ojos derechos e izquierdos y se evaluaron separadamente por cada ojo. Los humores acuosos de los 16 ojos izquierdos (contra lateral, no tratados) se utilizaron como control de los niveles de hTNFR-Is.

Se evaluó el efecto biológico de hTNFR-Is producido en el ojo después de la inyección de pVAX2 hTNFR-Is/mlgG1 en el músculo ciliar (con o sin electrotransferencia adicional) en las ratas con uveítis inducida por endotoxina (EIU), un modelo para la inflamación intraocular humana aguda (2-5).

Veinticuatro ratas recibieron una inyección de 3 µg de pVAX2 hTNFR-Is/mlgG1 en ambos ojos. A la inyección del plásmido le siguió una electrotransferencia en 12 de estas 24 ratas. Doce ratas de control recibieron una inyección de plásmido "vacío" pVAX2 (sin el gen que codifica para hTNFR-Is) en el músculo ciliar. A la inyección del plásmido vacío le siguió una electrotransferencia en los ojos derechos de estas 8 ratas.

Siete días después de los tratamientos anteriores, se indujo la EIU en las 44 ratas mediante la inyección de 150 µg de *Salmonella Typhimurium* LPS (Sigma-Aldrich) en la pata trasera derecha.

Las escalas clínicas de EIU se recogieron 24 horas después de la estimulación con LPS y las ratas se sacrificaron.

En cada grupo de ratas, los humores acuosos obtenidos de los ocho ojos se utilizaron para evaluar el nivel de secreción de hTNFR- α de rata. Para permitir una evaluación exacta, se mezclaron dos humores acuosos de dos ojos que recibieron el mismo tratamiento y que mostraron una puntuación clínica similar de EIU. Cuatro ojos de cada grupo (excepto del grupo de ratas tratadas con el plásmido vacío) se crioseccionaron y se procesaron para establecer una escala histológica de células inflamatorias infiltradas.

Tabla 1: resumen de todos los grupos animales experimentales

Número de ratas	Tratamiento	ET	EIU	Destino
4	pEGFP-C1, 3µg		0	Crio-sección el día 8
8	pEGFP-C1, 3µg	+	0	Crio-sección el día 8
2	Solución salina. 10µl		0	Crio-sección el día 8
2	Solución salina. 10µl	+	0	Crio-sección el día 8
24	pVAX2-luc 3µgOD		0	Cinéticas de actividad de la luciferasa
2	pVAX2-luc 3µg OS Ninguno (OD y OS)	+ 0	0	
8	pVAX2hTNFR-Is/mlgG1 30µg		0	Muestra de hTNFR-Is
8	pVAX2hTNFR-Is/mlgG1 30µg	+	0	Muestra de hTNFR-Is
12	Ninguno		+	8 para muestras de hTNFR-Is en AH 4 para gradación histológica de EIU
12	pVAX2hTNFR-Is/mlgG1 3µg		+	8 para muestras de TNF-α en AH 4 para gradación histológica de EIU
12	pVAX2hTNFR-Is/mlgG1 3µg	+	+	8 para muestras de TNF-α en AH 4 para gradación histológica de EIU
12	Solución salina 10µl	+	+	8 para muestras de TNF-α en AH 4 para gradación histológica de EIU
12	0		+	8 para muestras de TNF-α en AH 4 para gradación histológica de EIU
8	Plásmido vacío 3µg	+	+	8 para muestras de TNF-α en AH

Evaluación de la electrotransferencia de pVAX2 hTNFR-Is/mlgG1 en la intensidad de EIU

5 Se utilizó el sistema de escala clínica tal como se publicado previamente (5) con pequeñas adaptaciones. Brevemente, el grado (0) indica que no existe inflamación. El grado (1) indica una pequeña vasodilatación del iris y de los vasos conjuntivales sin inflamación o células en la cámara anterior (CA). El grado (2) indica la presencia de una vasodilatación moderada del iris y de las conjuntivas pero sin inflamación o células evidentes en la CA. El grado (3) indica la presencia de una intensa vasodilatación de los vasos del iris con inflamación y menos de 10 células por campo de la lámpara de hendidura en la CA. El grado (4) indica la presencia de signos clínicos similares a las del grado 3 con muchas células en la CA formando un hipopión o fibrina. El grado (5) indica la presencia de una intensa reacción inflamatoria en la CA con un aislamiento total de la pupila.

15 Para la evaluación histológica de la intensidad de la EIU, se enuclearon 4 ojos de cada grupo, se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 1 hora, se enjuagaron en PBS, se montaron en OCT y se crio-seccionó la totalidad del globo ocular. Se tiñeron las secciones de globo ocular a través del nervio óptico de cada ojo con hematoxilina-eosina. El número medio de células infiltradas por sección presentes en los segmentos anterior y posterior se obtuvo dividiendo el número total de células por el número de secciones examinadas del mismo ojo. El número de células infiltradas se registró por un investigador que ignoraba el tratamiento.

Nivel de hTNFR-Is soluble en el humor acuoso de ratas con o sin EIU

25 Se midieron los niveles de receptores de hTNFR-Is mediante ELISA utilizando un kit específico de receptor humano de tipo I (Duoset, R&D Systems, Abingdon, RU) según las instrucciones del fabricante. Para evaluar el paso sistémico de hTNFR-Is producido en el segmento anterior de los ojos, se determinaron las concentraciones séricas de hTNFR-Is mediante el mismo procedimiento.

Nivel de TNF-α en el humor acuoso de ratas con o sin EIU

30 Los humores acuosos obtenidos se centrifugaron inmediatamente y se recogió la fracción de célula libre y se congeló a una temperatura de -20°C antes del análisis. Se midieron los niveles de TNF-α de rata utilizando un ELISA específico para TNF-α de rata (Duoset, R&D Systems, Abingdon, RU). Se utilizó el mismo procedimiento que para la evaluación de los niveles de receptores de TNF-α, con una captura de anticuerpo a 4 µg/ml, un anticuerpo de detección a 100 ng/ml, y una dilución seriada del doble de recombinante del TNF-α de rata de 400 pg/ml a 62,5 pg/ml.

Análisis estadístico

40 Los resultados se expresan en medias ± error estándar de la media (SEM). Los datos se compararon utilizando ANOVA con comparaciones por parejas mediante los procedimientos de Bonferroni/Dunn.

Seguridad de la electrotransferencia (también denominada electroporación)

Los exámenes clínicos en la lámpara de hendidura de los ojos tratados en los días 1 y 8 después de la electrotransferencia de GFP o solución salina no mostraron signos clínicos de inflamación intraocular o un daño estructural grave.

Después del sacrificio de las ratas, se obtuvieron y se examinaron las secciones histológicas de los ojos tratados. El estudio histológico de las secciones a través de la inserción de la aguja para la inyección muscular intraciliar y los sitios de electrotransferencia mostraron en pocos casos la presencia de un leve infiltrado celular en el túnel de la córnea pero no en músculo ciliar. Las estructuras oculares no estaban afectadas y conservaban una anatomía normal.

También, el TNF- α en el humor acuoso de los ojos de las ratas con EIU sometidas a electrotransferencia después de la inyección de solución salina no aumentó en comparación con el TNF- α del humor acuoso en las ratas con EIU control ($P=0,10$). Por lo tanto, la electrotransferencia *per se* no aumenta la producción de la TNF- α en los ojos de ratas con EIU.

Electrotransferencia de plásmidos que codifican para GFP en el músculo ciliar

Ocho días después de la electrotransferencia de GFP que codifica para plásmidos, las secciones longitudinales mostraron una señal fluorescente específica localizada en el músculo ciliar. Las células fluorescentes alargadas corresponden a las miofibras transversales del músculo ciliar (Figura 2A, a y B) como se demuestra mediante la inmunolocalización de la actina del músculo liso alfa (α -sm-1) (Figura 2C).

En las secciones frontales anteriores, las miofibras circulares se identifican alrededor del cuerpo ciliar justo debajo de la esclerótica (Figura 3A). LA GFP se expresa de forma elevada en ambas secciones anteriores, mostrando fibras circulares (Figura 3B) y en más secciones posteriores, mostrando la GFP tiñendo en tubos redondos que corresponde a las fibras radiales y longitudinales (Figura 3C). En las secciones frontales anteriores, las fibras circulares de los músculos ciliares se identifican claramente mediante la inmunotinción de α -sm-1 (Figura 3D). la colocalización de GFP y α -sm-1 confirmó que la GFP se expresó en las fibras musculares después de la electrotransferencia (Figura 3E).

Cuando se realizó la inyección del plásmido de la GFP sin la electrotransferencia, se observaron escasos puntos fluorescentes en la raíz del cuerpo ciliar, pero las miofibras circulares no mostraron ninguna señal fluorescente (Figura 4A, a).

Cinética de la expresión de la luciferasa

No se observó una actividad significativa de luciferasa en el músculo ciliar de las ratas inyectadas con 3 μ g de pVAX2-luc sin electrotransferencia. Sin embargo, se observó /midió una actividad elevada y sostenida de luciferasa en el músculo ciliar de las ratas que recibieron electrotransferencia después de la inyección de 3 μ g de pVAX2-luc hasta por lo menos 30 días, en el momento en el que parecía que se había alcanzado un valor estable (Figura 5).

Producción del receptor soluble hTNFR-I_s en el humor acuoso

En el humor acuoso de los ojos de las ratas sin EIU, 7 días después de la inyección de 30 μ g de pVAX2 hTNFR-I_s/mlgG1 (sin electrotransferencia), el nivel medio de hTNFR-I_s fue de 274 \pm 39 pg/ml ($n=4$).

En los ojos tratados en combinación con una electrotransferencia, el nivel medio fue de 691 \pm 121 pg/ml ($n=4$) ($P<0,01$). En los ojos contralaterales de las ratas que recibieron la inyección de plásmido en el ojo contiguo con o sin electrotransferencia, no se encontró un nivel detectable de hTNFR-I_s. En el suero de las ratas de todos los grupos, los niveles de hTNFR-I_s estaban por debajo del nivel de detección, demostrando por lo tanto la ventaja de la invención para permitir la producción y liberación de una proteína local transgénica.

En ratas con EIU, el nivel medio de hTNFR-I_s fue de 181 \pm 108 pg/ml ($n=8$) sólo en el grupo de ratas después de la inyección ciliar de 30 μ g de pVAX2 hTNFR-I_s/mlgG1. En el humor acuoso de los ojos que recibieron la combinación de la inyección junto con la electrotransferencia, el nivel de hTNFR-I_s fue significativamente más elevado de 1070 \pm 218 pg/ml ($n=8$), $P<0,05$. En las ratas con EIU que no recibieron la inyección la intraciliar de plásmido, con o sin electrotransferencia (grupos de control) no se encontraron niveles detectables de hTNFR-I_s lo que demuestra que la prueba de ELISA era específica para hTNFR-I_s humano y no interfería con los receptores solubles de hTNFR-I_s de rata. En el suero de ratas con EIU, los niveles de hTNFR-I_s estaban por debajo de los niveles de detección tanto si el tratamiento se realizaba sólo con el plásmido o en combinación con la electrotransferencia, demostrando que la difusión sistémica de hTNFR-I_s intraocular era insignificante.

Efecto en EIU clínica

5 Cuando se utilizó la dosis baja de plásmido hTNFR-I_s/mI_gG1 de 3 µg para la inyección intramuscular, la escala media de EIU fue de 3,7 ± 0,2, similar a las puntuaciones de EIU 3,8 ± 0,2 y 3,9 ± 0,1 (P= 0,81 y P= 0,62 respectivamente) para la EIU, los grupos de ratas sin inyección de plásmido y las inyectadas con electrotransferencia de solución salina (Figura 7A). La puntuación media de EIU clínica se redujo significativamente en el grupo de ratas que se electrotransfectaron con 3 µg de pVAX2 hTNFR-I_s/mI_gG1 (1,2 ± 0,2, P<0,0001), lo que demuestra que la combinación con electrotransferencia reducía significativamente la uveítis clínica en comparación con simplemente una inyección de plásmido (P<0,0001) o ningún tratamiento (P<0,0001).

10 En el grupo de ratas tratadas con la inyección intraciliar de 3 µg de plásmido vacío combinado con la electrotransferencia, la puntuación de EIU fue de 3,8 ± 0,2. La puntuación de EIU en este grupo de ratas no fue significativamente diferente a la obtenida en el grupo de control con EIU inyectado con plásmido (P= 0,91) o el grupo de ratas con EIU que recibió electrotransferencia de solución salina (P= 0,85).

Efecto sobre el infiltrado celular

20 En el grupo de control de ratas con EIU, el número medio de células infiltradas en el segmento anterior fue de 316 ± 14 (n= 4) y 272 ± 66 en el segmento posterior. No se observó ninguna diferencia significativa en el número de células infiltradas en el segmento anterior (369 ± 65, P= 0,77) o en el segmento posterior (261 ± 32, P= 0,99) en el grupo de ratas tratadas sólo con la inyección de 3 µg de pVAX2 hTNFR-I_s/mI_gG1.

25 La inyección intraciliar del plásmido vacío en combinación con la electrotransferencia no presentó ningún efecto sobre el número de células infiltradas en el segmento anterior (322 ± 26, P= 0,99) o en el segmento posterior (255 ± 13, P= 0,98) en comparación con el grupo de control con EIU sin inyección de plásmido.

30 En las ratas tratadas con 3 µg de pVAX2 hTNFR-I_s/mI_gG1 mediante inyección intraciliar combinada con electrotransferencia, se observó una notable reducción del número de células infiltradas tanto en el segmento anterior (49 ± 1, P<0,002 *versus* el grupo de control y NaCl) y en el segmento posterior (88 ± 3, P<0,05 *versus* el grupo de control) de los ojos estas ratas (Figuras 8A y B).

Niveles de TNF-α en el humor acuoso

35 El nivel medio de TNF-α en el humor acuoso de las ratas de Lewis con EIU (510 ± 44 pg/ml) no fue significativamente diferente al del grupo de ratas que recibieron tratamiento con solución salina y electrotransferencia (374 ± 65 pg/ml, P= 0,10).

40 El nivel medio de TNF-α se redujo significativamente en el grupo de ratas tratadas con electrotransferencia de 3 µg de pVAX2 hTNFR-I_s/mI_gG1 (126 ± 16 pg/ml) en comparación con las ratas que recibieron electrotransferencia de solución salina (P<0,002) o las ratas control con EIU (P<0,0005). En el grupo de ratas que recibieron la inyección de 3 µg de pVAX2 hTNFR-I_s/mI_gG1 en el músculo ciliar sin liberación de campo eléctrico, el nivel medio de TNF-α fue de 250 ± 45 pg/ml, es decir, no significativamente diferente del nivel de TNF-α en las ratas con EIU con electrotransferencia de solución salina (P=0,07).

45 La electrotransferencia del plásmido vacío no presenta ningún efecto en los niveles de TNF-α en el humor acuoso en comparación con el grupo de control tratado con solución salina (478 ± 33 pg/ml, P= 0,14). En las ratas sin tratamiento no se detectó TNF-α.

Discusión

50 La electrotransferencia de un plásmido de ADN en el músculo esquelético es una técnica de transferencia genética segura y eficaz que puede producir la expresión de niveles elevados de proteínas en circulación (1; 6-11). Se han introducido parámetros eléctricos selectivos (10, 12, 13, 14).

55 En el ojo, el músculo ciliar es un músculo liso especial. Algunas fibras de dicho músculo están orientadas de forma circular mientras que otras están orientadas longitudinalmente o radialmente por contacto con el espolón de la esclerótica. Debido a su localización superficial, debajo de la esclerótica, en el cruce entre los segmentos anterior y posterior, los inventores han considerado que el músculo ciliar es un candidato ideal para la electrotransferencia de genes que codifican para proteínas potencialmente terapéuticas. La posible transfección de estos genes en el músculo ciliar y la secreción de las proteínas codificadas en el humor acuoso o en el vítreo resulta muy interesante y fue el principal objeto de sus investigaciones. Hasta la fecha, no se ha intentado previamente utilizar el músculo ciliar como un objetivo para la electrotransferencia.

65 Para controlar la inyección muscular intraciliar del plásmido en los ojos de las ratas, se creó un túnel. El túnel se inició en la córnea y se extendía hacia el área del limbo y más hacia atrás por debajo de la esclerótica en el músculo ciliar. El electrodo activo, recubierto con un material aislante en toda su longitud excepto en la parte insertada en el

músculo, se introdujo por el túnel creado. La electrotransferencia se realizó de una manera controlada reduciendo el riesgo de quemaduras eléctricas. Utilizando esta técnica, la electrotransferencia después de una inyección intraciliar de solución salina no afectaba a los resultados clínicos de la EIU y no aumentaba los niveles de TNF- α en el humor acuoso, lo que sugiere que la electrotransferencia, bajo estas condiciones específicas, no provoca una inflamación intraocular. Cuando la inflamación intraocular ya estaba presente, en ratas con EIU inducida, la reacción no aumentó y el proceso de la enfermedad no se agravó después de la electrotransferencia.

Los experimentos también mostraron que el plásmido de ADN se puede introducir en el músculo ciliar de los ojos de las ratas, transfecta eficiente y específicamente las fibras de las células musculares mediante la aplicación de la electrotransferencia. Utilizando sondas de electrodos concebidos recientemente con este objeto, se ha demostrado que la proteína transgénica GFP trazadora se puede localizar específicamente en el músculo ciliar. También se ha demostrado la expresión de la actividad de la luciferasa en los ojos tratados hasta por lo menos 30 días después de la electrotransferencia. Además, después de la inyección en el músculo ciliar de plásmido con un gen que codifica para el receptor soluble de TNF- α humano y la aplicación de la electrotransferencia, se midieron niveles elevados del receptor soluble de la proteína en el humor acuoso de las ratas tratadas. Como hecho interesante, estas ratas no presentaban un receptor de TNF- α humano detectable en su suero o en el ojo contiguo. Estos descubrimientos demuestran que se puede conseguir una producción local de proteínas con aplicaciones terapéuticas potenciales y que la proteína producida localmente permanece mayoritariamente confinada en el ojo tratado.

El éxito y la reproducibilidad de la electrotransferencia depende de una administración eficaz de una cantidad suficiente de plásmido de ADN en el tejido diana, de una intensidad de campo eléctrico seleccionada correctamente y de la distancia controlada entre los dos electrodos, ya que esta distancia determina el valor del campo eléctrico (en V/cm) (11, 12).

Los experimentos sobre la expresión de la GFP mostraron que cuando no se aplicaba un suministro de impulso eléctrico después de la inyección de una dosis elevada de plásmido (30 μ g), las células que expresaban la GFP estaban localizadas de forma dispersa en la región ciliar. Por otro lado, cuando la electrotransferencia se realizaba después de la inyección de plásmido de ADN, se detectó una expresión elevada de GFP en las fibras de las células musculares, que permitía una producción continuada de proteínas, tal como se representa mediante la actividad de la luciferasa hasta un mes después de la electrotransferencia.

El músculo esquelético extraocular se puede utilizar con un fin terapéutico similar al del músculo ciliar. Con ello, se ha descubierto una elevada capacidad de electrotransferencia de plásmidos en el músculo extraocular.

El efecto beneficioso de la electrotransferencia del plásmido hTNFR-I s /mIgG1 en EIU fue el resultado de la producción de hTNFR-I s en el medio ocular, ya que no se observó ningún efecto sólo con la inyección del plásmido o con la electrotransferencia de control (solución salina y plásmido vacío) que no produjo ninguna producción de proteína terapéutica. Esto fue corroborado por el hecho de que el nivel de TNF- α en las ratas tratadas con la dosis baja de plásmido (3 μ g) combinada con la electrotransferencia se reducía significativamente en comparación con los niveles de TNF- α en los grupos de control o en el grupo de ratas tratadas con una sola inyección de plásmido. En el grupo de ratas tratadas con la electrotransferencia del plásmido terapéutico, el número de células inflamatorias infiltradas se redujo significativamente tanto en el segmento anterior como en el segmento posterior del ojo, lo que sugiere que el TNFR-I s también se había producido en el vítreo de los animales tratados, lo que resulta interesante para el tratamiento de las enfermedades de la retina.

El TNF- α es una importante citocina proinflamatoria implicada en la patogénesis de la inflamación intraocular (15, 16). Su mecanismo de acción exacto sigue sin comprenderse completamente (17). Pero se obtienen efectos beneficiosos evidentes en los procesos actuales para las enfermedades inflamatorias oculares mediante la utilización de agentes de bloqueo de TNF- α durante las enfermedades inflamatorias oculares experimentales (18, 19) y clínicas (20, 21, 22). El TNF- α se une a receptores de unión a membrana TNFR-I (p55, 55kd) o TNFR-II (p55, 75kd). Las formas solubles naturales de estos dos receptores neutralizan la actividad proinflamatoria de la TNF- α pero son muy inestables. Por lo tanto, en la clínica, las estrategias anti-TNF utilizan o anticuerpos monoclonales contra la TNF (Infliximab y Adalimumab) o receptores solubles de TNF- α estabilizados mediante un fragmento de inmunoglobulina, TNFR-I s /Fc (Etanercept) o TNFR-I s /Fc (Lenercept). El tratamiento sistémico con Etanercept reduce las escalas clínicas de EIU y la infiltración de células oculares (19). Los pacientes con una inflamación intraocular posterior tratados con TNFR-I s /Ig (p55) administrado sistemáticamente presentan una mejora clínica evidente junto con el hallazgo de un aumento en el número de células sanguíneas periféricas CD4⁺T que expresan IL-10 (23). Sin embargo, la administración sistemática de un anti-TNF- α está asociada a efectos secundarios graves (22). Los experimentos demuestran que la producción intraocular local de TNFR-I s por las fibras musculares ciliares después de la electrotransferencia del plásmido hTNFR-I s /mIgG1, reduce significativamente la intensidad de los parámetros clínicos e histológicos de la enfermedad en la EIU. En estas ratas con EIU tratadas, no se encontraron niveles detectables de TNFR-I s en el suero. Por lo tanto, la electrotransferencia en el músculo ciliar del plásmido hTNFR-I s /mIgG1 puede ser una alternativa a la administración sistémica de anti-TNF- α en pacientes que padecen una inflamación intraocular grave refractaria a otras terapias médicas.

En conclusión, esta es la primera demostración de que el músculo ciliar ocular o músculo extraocular del ojo de la

rata puede actuar como diana para la electrotransferencia de un plásmido, produciendo una tasa de transfección eficaz, unos niveles elevados y una expresión de larga duración de las proteínas codificadas en el humor acuoso. Como prueba del concepto, esta técnica se aplicó con éxito en el tratamiento de ratas con EIU. La electrotransferencia del plásmido que codifica para hTNFR-Is/mlgG1 reduce significativamente la intensidad de la enfermedad ocular evaluada clínica e histológicamente. Este tipo de terapia abre nuevas e interesantes vías para el tratamiento de las enfermedades oculares.

Referencias

- 10 1. Bloquel, C., Fabre, E., Bureau, M.F. & Scherman, D. Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. *J Gene Med.* 6 Suppl 1, S11-23 (2004).
- 15 2. Hoekzema, R., Verhagen, C., van Haren, M. & Kijlstra, A. Endotoxin-induced uveitis in the rat. The significance of intraocular interleukin-6. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 33, 532-539 (1992).
3. Rosenbaum, J.T., McDevitt, H.O., Guss, R.B. & Egbert, P.R. Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature.* 286, 611-613 (1980).
- 20 4. de Vos, A.F., Klaren, V.N. & Kijlstra, A. Expression of multiple cytokines and IL-1 RA in the uvea and retina during endotoxin-induced uveitis in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 35, 3873-3883 (1994).
5. Behar-Cohen, F.F. *et al.* Iontophoresis of dexamethasone in the treatment of endotoxin-induced-uveitis in rats. *Exp Eye Res.* 65, 533-545 (1997).
- 25 6. Bettan, M. *et al.* High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Mol Ther.* 2, 204-210 (2000).
7. Aihara, H. & Miyazaki, J. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat Biotechnol.* 16, 867-870 (1998).
- 30 8. Cappelletti, M. *et al.* Gene electro-transfer improves transduction by modifying the fate of intramuscular DNA. *The Journal of Gene Medicine.* 5, 324-332 (2003).
9. Komamura, K. *et al.* Treatment of dilated cardiomyopathy with electroporation of hepatocyte growth factor gene into skeletal muscle. *Hypertension.* 44, 365-371 (2004).
- 35 10. Rubenstrunk, A., Mahfoudi, A. & Scherman, D. Delivery of electric pulses for DNA electrotransfer to mouse muscle does not induce the expression of stress related genes. *Cell Biol Toxicol.* 20, 25-31 (2004).
11. Bureau, M.F. *et al.* Intramuscular plasmid DNA electrotransfer: biodistribution and degradation. *Biochim Biophys Acta.* 1676, 138-148 (2004).
- 40 12. Molnar, M.J. *et al.* Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmidbased gene transfer into mouse muscles. *Mol Ther.* 10, 447-455 (2004).
- 45 13. Dean, D.A. Electroporation of the vasculature and the lung. *DNA Cell Biol.* 22, 797-806 (2003).
14. Šatkauskas S., *et al.* Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electropermeabilization and DNA electrophoresis. *Molecular Therapy*, 2002, Vol. 5 n°2, 133-140.
- 50 15. Koizumi, K. *et al.* Contribution of TNF-alpha to leukocyte adhesion, vascular leakage, and apoptotic cell death in endotoxin-induced uveitis in vivo. *Invest Ophthalmol vis Sci.* 44, 2184-2191 (2003).
16. Santos Lacomba, M. *et al.* Aqueous humor and serum tumor necrosis factor-alpha in clinical uveitis. *Ophthalmic Res.* 33, 251-255 (2001).
- 55 17. De Vos, A.F., Van Haren, M.A., Verhagen, C., Hoekzema, R. & Kijlstra, A. Systemic anti-tumor necrosis factor antibody treatment exacerbates endotoxin-induced uveitis in the rat. *Exp Eye Res.* 61, 667-675 (1995).
18. Dick, A.D., Forrester, J.V., Liversidge, J. & Cope, A.P. The role of tumour necrosis factor (TNF-alpha) in experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). *Prog Retin Eye Res.* 23, 617-637 (2004).
- 60 19. Avunduk, M.C. *et al.* Etanercept treatment in the endotoxin-induced uveitis of rats. *Exp Eye Res.* 79, 357-365 (2004).
- 65 20. Rosenbaum, J.T. & Smith, J.R. Anti-TNF therapy for eye involvement in spondyloarthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 20, S143-145 (2002).

21. El-Shabrawi, Y. & Hermann, J. Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy with infliximab as an alternative to corticosteroids in the treatment of human leukocyte antigen B27-associated acute anterior uveitis. *Ophthalmology*. 109, 2342-2346 (2002).
- 5
22. Murphy, C.C. *et al.* Tumor necrosis factor alpha blockade with infliximab for refractory uveitis and scleritis. *Ophthalmology*. 111, 352-356 (2004).
- 10
23. Greiner, K. *et al.* Anti-TNFalpha therapy modulates the phenotype of peripheral blood CD4+ T cells in patients with posterior segment intraocular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 45, 170-176 (2004).
24. DEZAWA M., TAKANO M., NEGISHI H., MO X., OSHITARI T. & SAWADA H. Gene transfer into retinal ganglion cells by in vivo electroporation: a new approach" *Micron*, 33, 1-6 (2002)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un ácido desoxirribonucleico (ADN) terapéutico para la preparación de una composición para el tratamiento de una enfermedad ocular mediante la administración de dicha composición en el tejido o células del músculo ciliar del sujeto que debe ser tratado, comprendiendo la administración una etapa de inyección y una etapa de electroporación que implica la aplicación de un campo eléctrico.
- 10 2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque el ácido nucleico se administra por una vía transesclerótica, transcorneal, intraocular o endoscópica.
3. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que la intensidad del campo es de entre aproximadamente 1 y 400 voltios/cm, preferentemente entre aproximadamente 50 y 200 voltios/cm, todavía más preferentemente entre aproximadamente 75 y 150 voltios/cm.
- 15 4. Utilización según la reivindicación 3, en la que la intensidad del campo es de 200 voltios/cm.
5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la duración total de la aplicación del campo eléctrico es de entre 0,01 y 500 milisegundos, preferentemente superior a 1 milisegundo.
- 20 6. Utilización según la reivindicación 5, en la que la duración total de la aplicación del campo eléctrico es de entre 10 milisegundos y 100 milisegundos y es preferentemente de 20 milisegundos.
7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la aplicación, a el/los tejido(s), del campo eléctrico comprende uno o más impulsos de frecuencia regular.
- 25 8. Utilización según la reivindicación 7, en la que la aplicación, a el/los tejido(s), del campo eléctrico comprende entre 1 y 100.000 impulsos de una frecuencia de entre 0,1 y 1.000 hertzios.
9. Utilización según la reivindicación 8, en la que la aplicación, a el/los tejido(s), del campo eléctrico comprende entre 1 y 10 impulsos, preferentemente 8 impulsos, de una frecuencia de entre 1 y 10 Hz, preferentemente de 5 Hz.
- 30 10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que los impulsos eléctricos se administran de una manera irregular unas con respecto a otras y en la que la función que describe la intensidad del campo eléctrico como una función del tiempo para un impulso es variable.
- 35 11. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la integral de la función que describe la variación del campo eléctrico con el tiempo es superior a $1 \text{ kV} \times \text{mseg/cm}$.
- 40 12. Utilización según la reivindicación 11, en la que esta integral es superior o igual a $5 \text{ kV} \times \text{mseg/cm}$.
13. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que los impulsos eléctricos son impulsos de ondas unipolares o bipolares.
- 45 14. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que los impulsos eléctricos se seleccionan de entre ondas exponencialmente decrecientes, ondas unipolares oscilatorias de duración limitada u otras formas de ondas.
- 50 15. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 14, en la que los impulsos eléctricos comprenden impulsos de onda cuadrada.
16. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 15, en la que los impulsos eléctricos comprenden impulsos de ondas bipolares de oscilación.
- 55 17. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que la administración comprende una etapa de electroporación que implica la aplicación, a el/los tejido(s), de un campo eléctrico que comprende 8 impulsos de ondas cuadradas unipolares, de una frecuencia de 5 Hz, siendo la intensidad de cada impulso de 200 voltios/cm para una duración total de la aplicación del campo eléctrico de 20 ms por impulso.
- 60 18. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que los impulsos eléctricos deben ser aplicados utilizando por lo menos dos electrodos distantes entre sí menos de un centímetro, y siendo por lo menos uno de dichos electrodos introducido en el tejido o las células del músculo ciliar.
19. Utilización según la reivindicación 18, en la que los electrodos son distantes entre sí menos de 10 milímetros, preferentemente menos de 8 ó 5 milímetros, todavía más preferentemente menos de 2 milímetros.
- 65 20. Utilización según la reivindicación 18 ó 19, en la que un electrodo se aplica de manera reversible sobre la

superficie de la esclerótica o la conjuntiva del ojo, preferentemente la conjuntiva límbica.

- 5 21. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en la que la etapa de iontoforesis se realiza antes, durante o después de la etapa de electroporación.
22. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en la que el ácido desoxirribonucleico terapéutico es un ADN bicatenario, un ADN monocatenario o un ADN en forma de complejo.
- 10 23. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en la que el ácido desoxirribonucleico terapéutico es un plásmido.
24. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en la que el ácido desoxirribonucleico terapéutico contiene secuencias que permiten y/o promueven la expresión en el tejido o las células del músculo ciliar.
- 15 25. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en la que la composición se inyecta en múltiples lugares.
- 20 26. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en la que el ácido desoxirribonucleico codifica una proteína seleccionada de entre enzimas, derivados de la sangre, hormonas, linfoquinas, citocinas, quimiocinas, factores antiinflamatorios, factores de crecimiento, factores tróficos, factores neurotróficos, factores hematopoyéticos, factores angiogénicos, factores antiangiogénicos, inhibidores de la metaloproteínasa, reguladores de la apoptosis, factores de coagulación, sus receptores, un péptido que es un agonista o antagonista de un receptor o de una proteína de adhesión, antígenos, anticuerpos, sus fragmentos y otros constituyentes esenciales de la célula.
- 25 27. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en la que la enfermedad ocular tratada se selecciona de entre enfermedades oculares inflamatorias, enfermedades isquémicas, enfermedades proliferativas, enfermedades neurodegenerativas y glaucoma.
- 30 28. Utilización según la reivindicación 27, en la que la enfermedad proliferativa es una enfermedad neovascular o glial.
- 35 29. Utilización según la reivindicación 27, en la que la enfermedad ocular tratada se selecciona de entre escleritis, conjuntivitis, queratitis, endotelitis, uveítis, coroiditis, retinitis, retinocoroiditis, uveítis anterior, retinopatía del prematuro, retinopatía diabética, retinopatía proliferativa del vítreo, distrofias retinianas hereditarias, degeneración macular asociada a la edad, glaucoma de ángulo abierto, glaucoma neovascular y retinopatía isquémica.
- 40 30. Utilización de un ácido desoxirribonucleico (ADN) terapéutico para la preparación de una composición para el tratamiento de una enfermedad ocular mediante la administración de dicha composición en el tejido o las células del músculo ciliar del sujeto que se debe tratar, comprendiendo la administración una etapa de inyección y una etapa de electroporación, en la que durante la etapa de electroporación se aplican impulsos eléctricos entre por lo menos dos electrodos distantes entre sí menos de un centímetro, siendo un electrodo aplicado de manera reversible sobre la superficie de la esclerótica o la conjuntiva del ojo y siendo por lo menos un electrodo introducido en el tejido o las células del músculo ciliar.
- 45 31. Ácido desoxirribonucleico (ADN) terapéutico para su utilización en el tratamiento de una enfermedad ocular mediante la administración de dicho ADN terapéutico en el tejido o las células del músculo ciliar del sujeto que se debe tratar, comprendiendo la administración una etapa de inyección y una etapa de electroporación que implica la aplicación de un campo eléctrico.

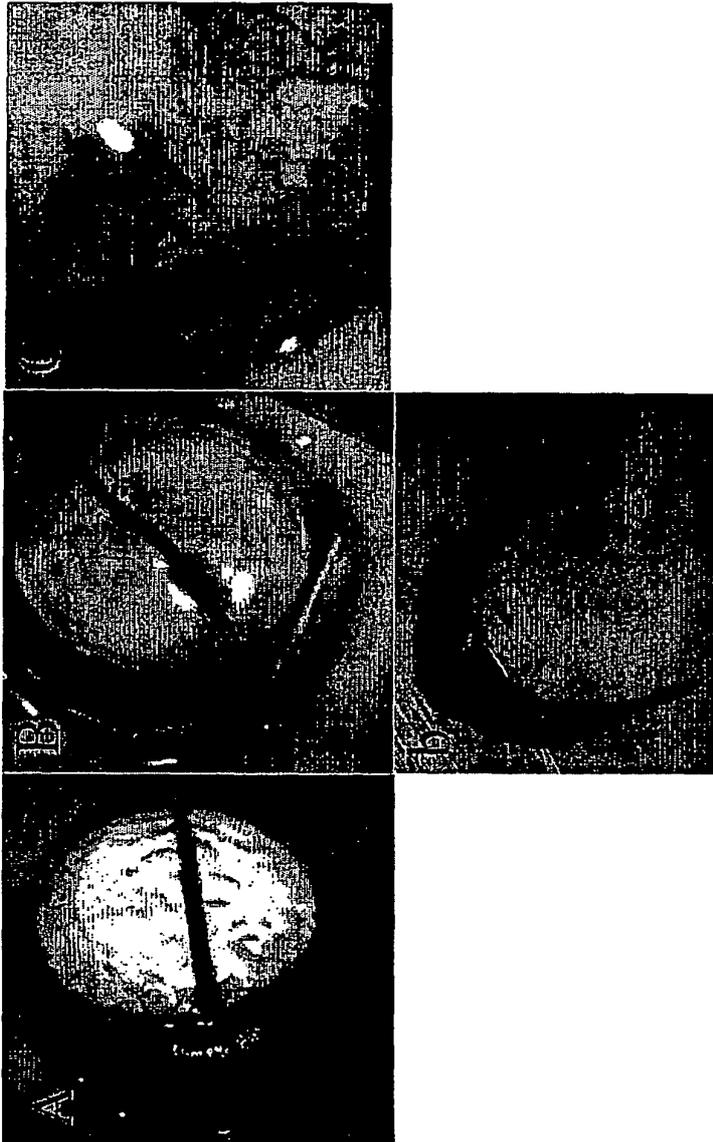


Figura 1

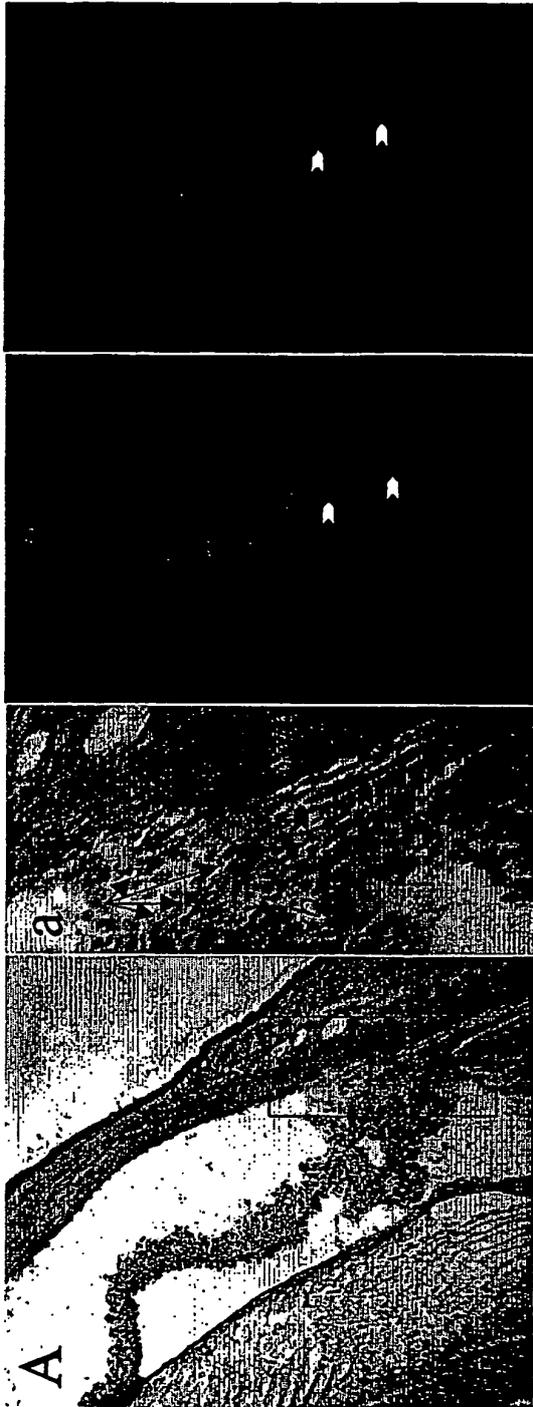


Figura 2

E



Figura 3

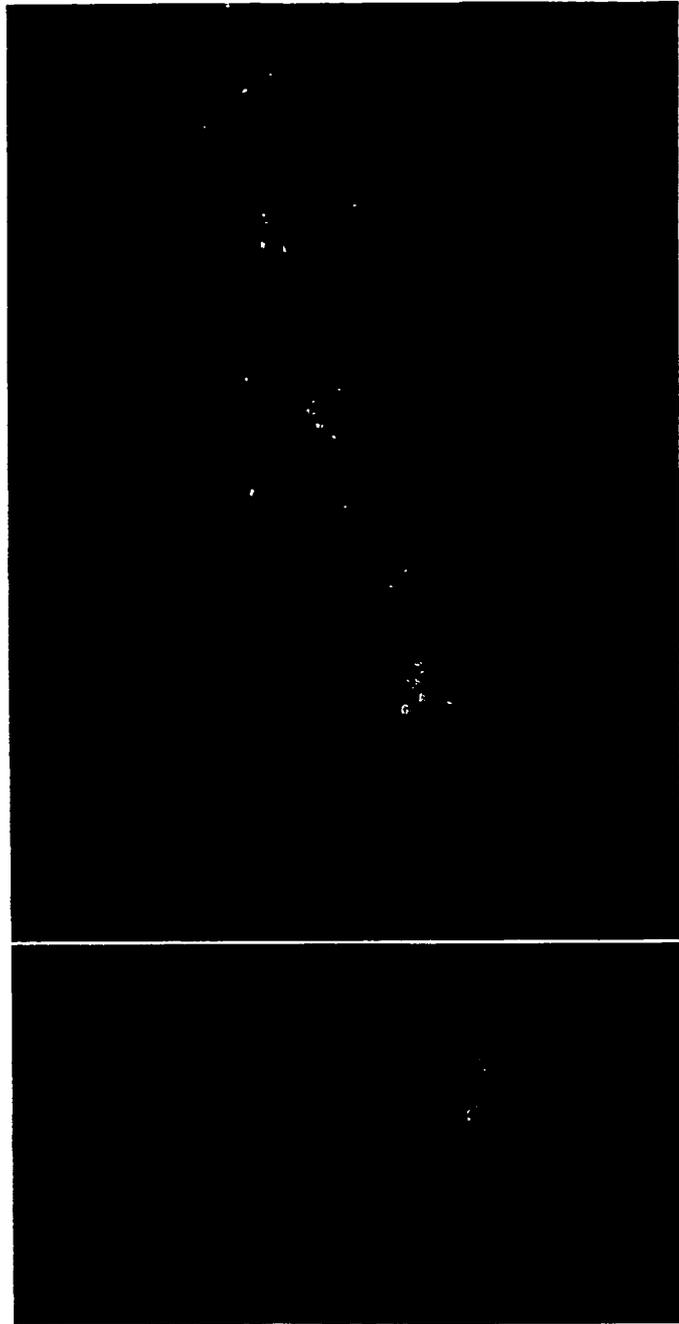


Figura 4

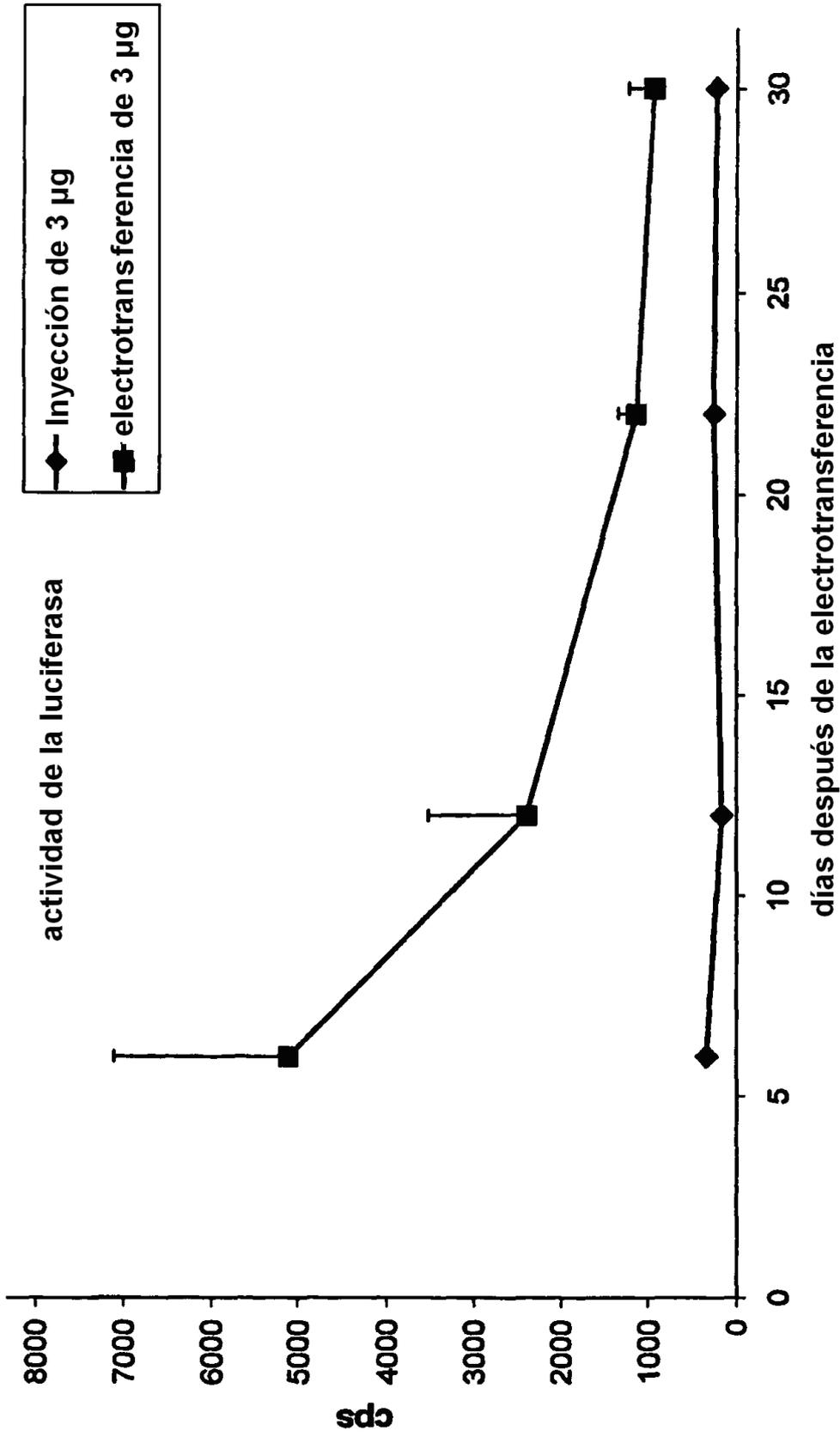


Figura 5

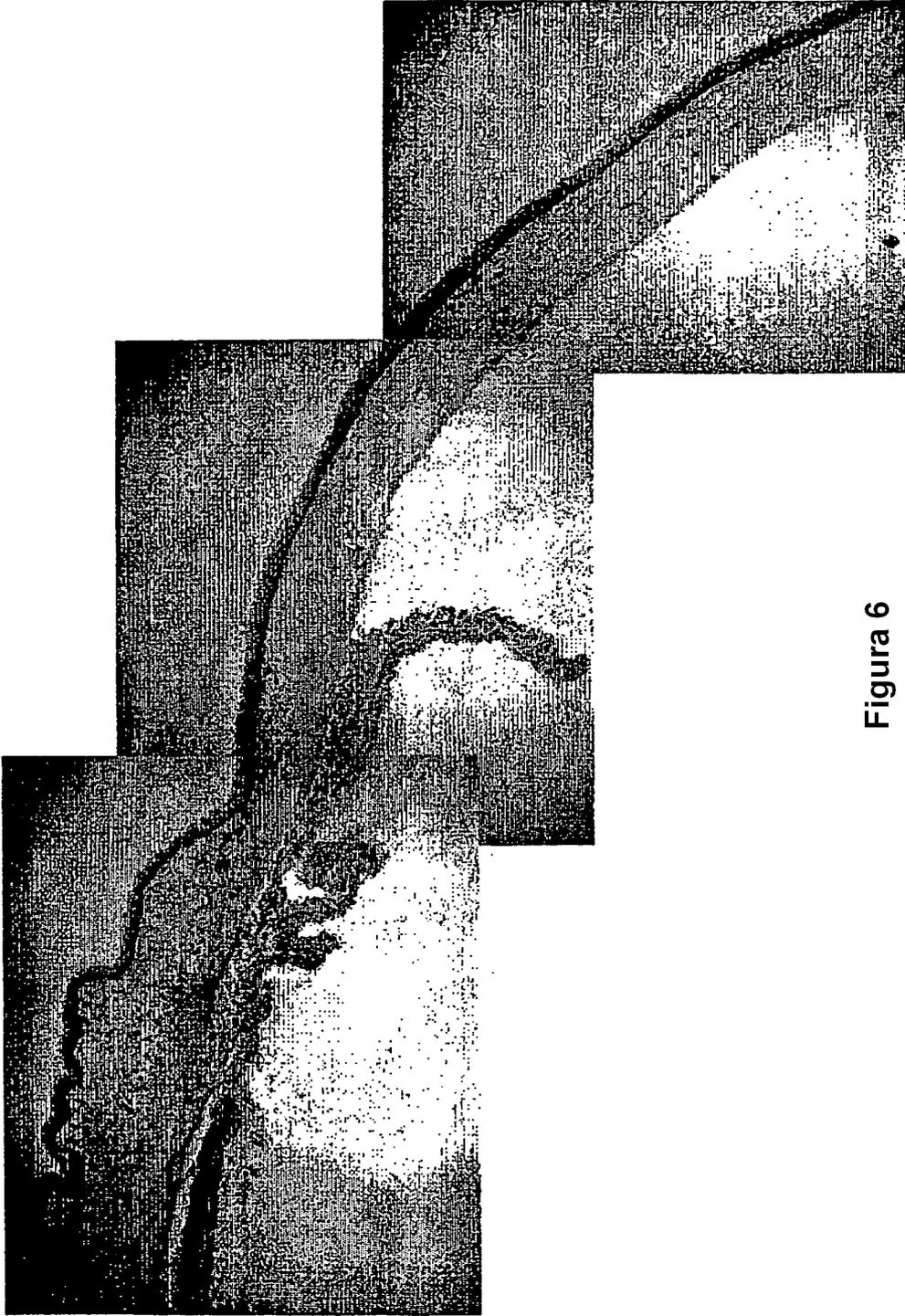


Figura 6

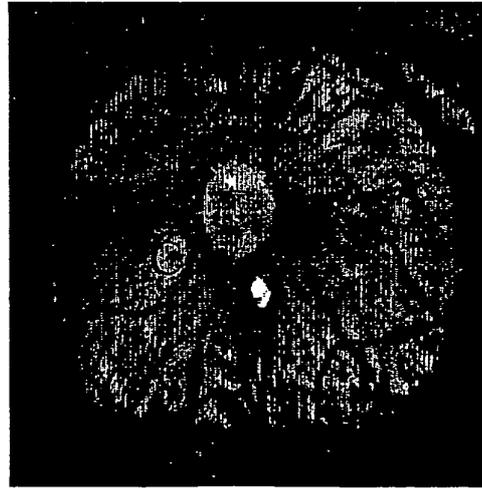
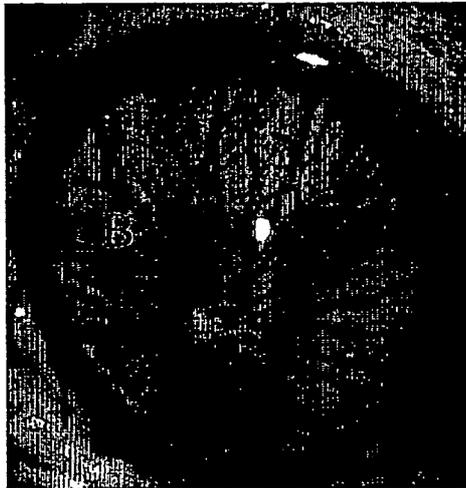
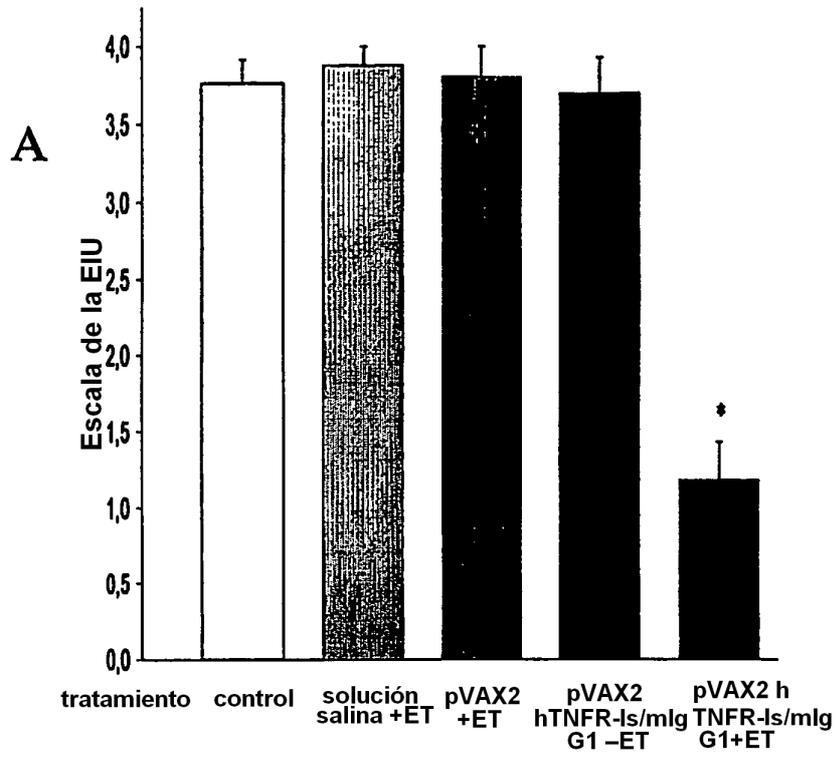


Figura 7

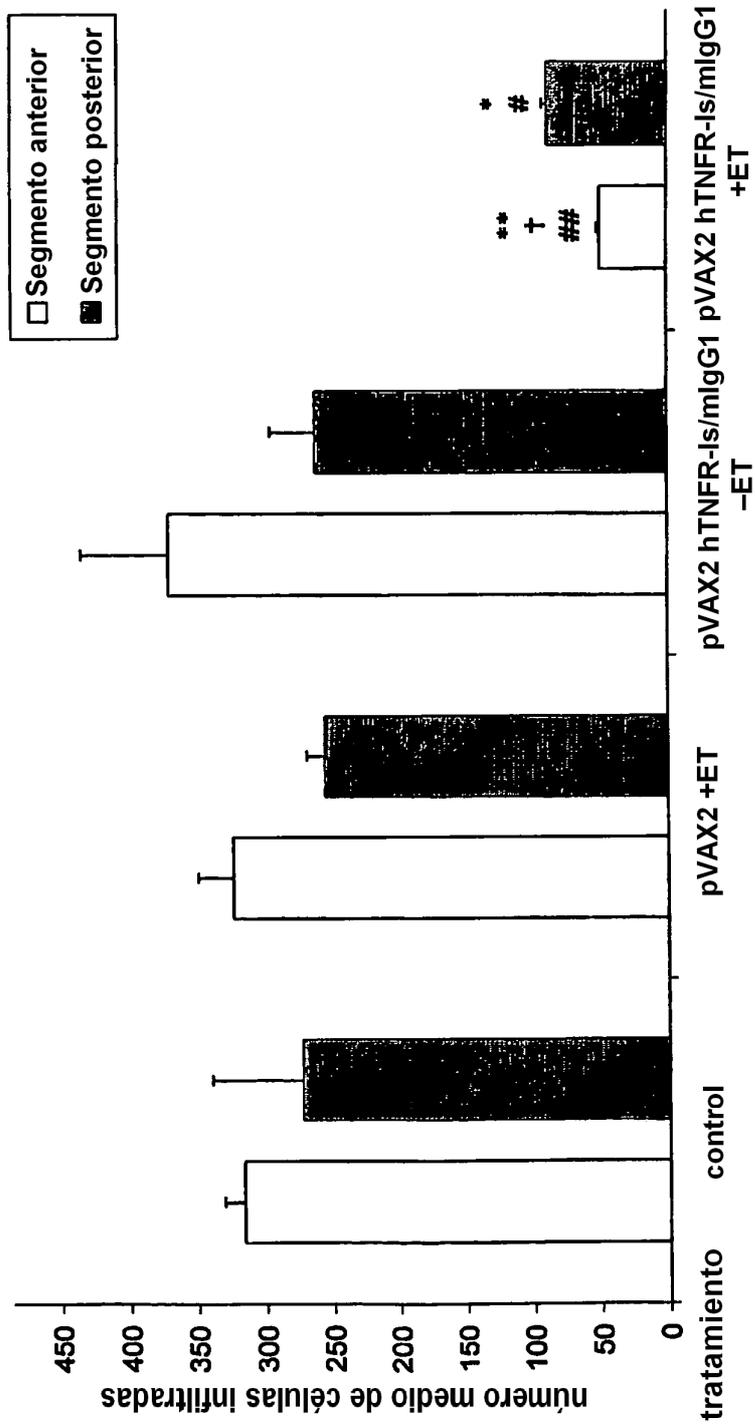


Figura 8A

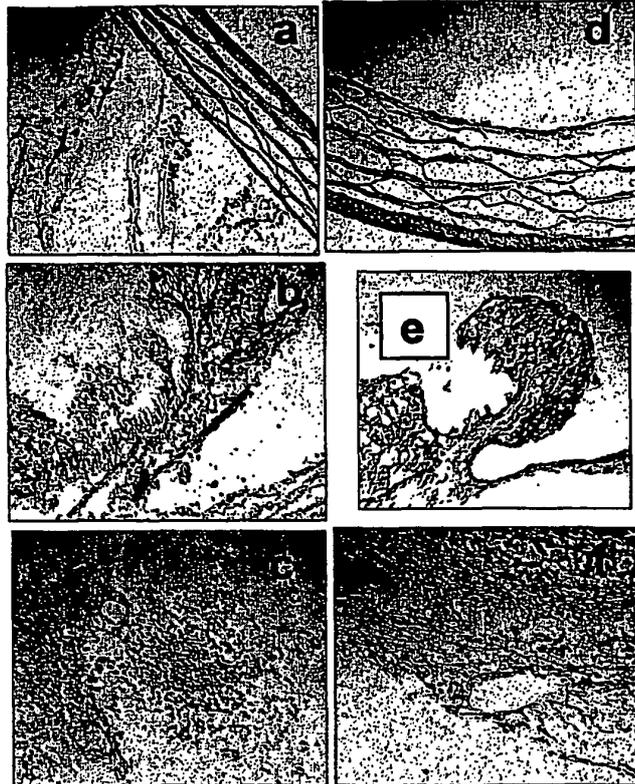


Figura 8B

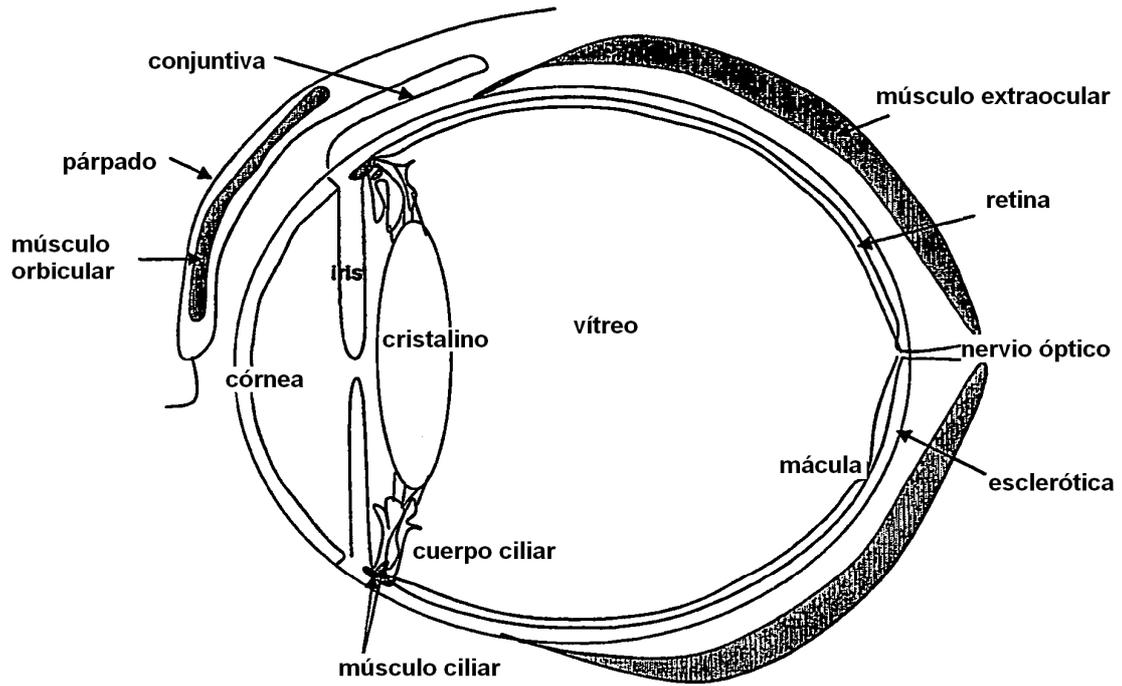


FIGURA 9

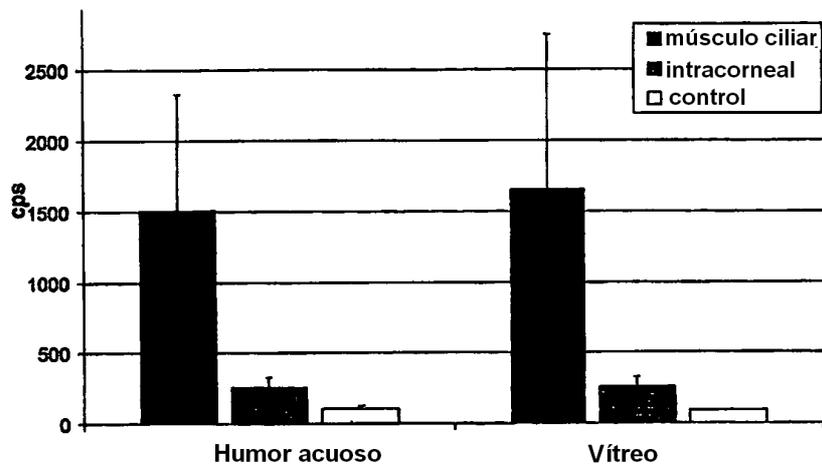


FIGURA 10

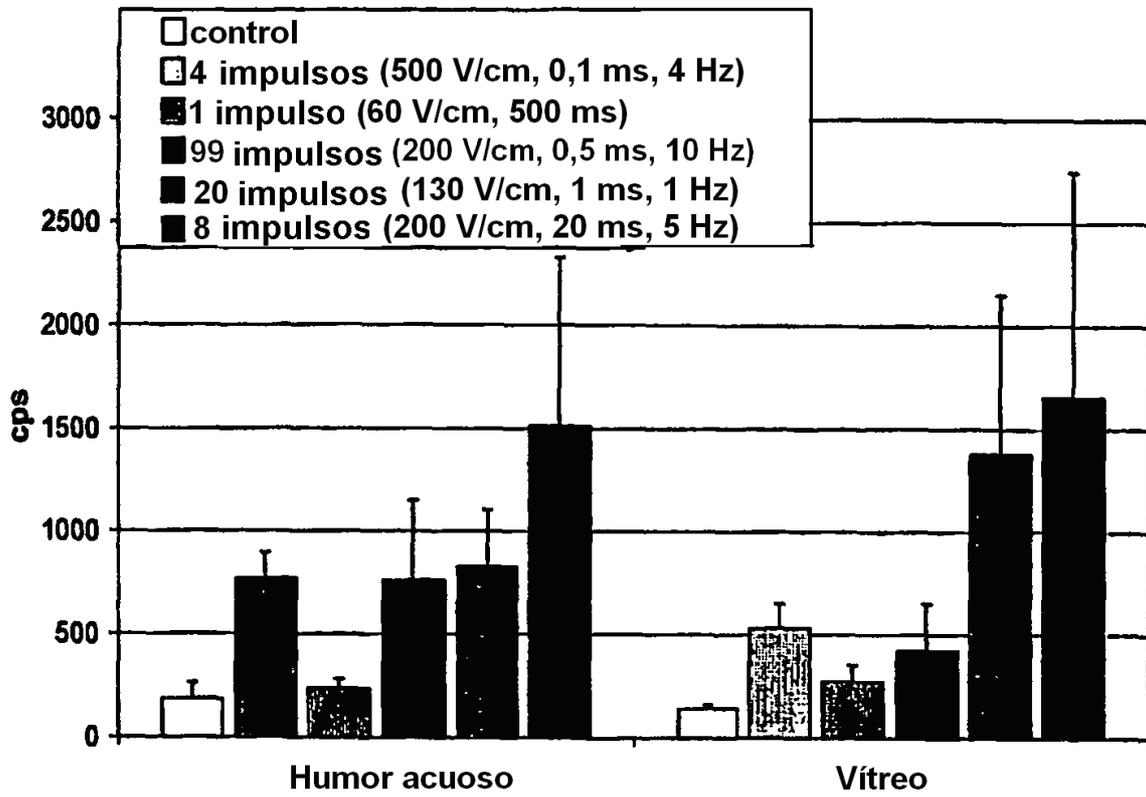


FIGURA 11

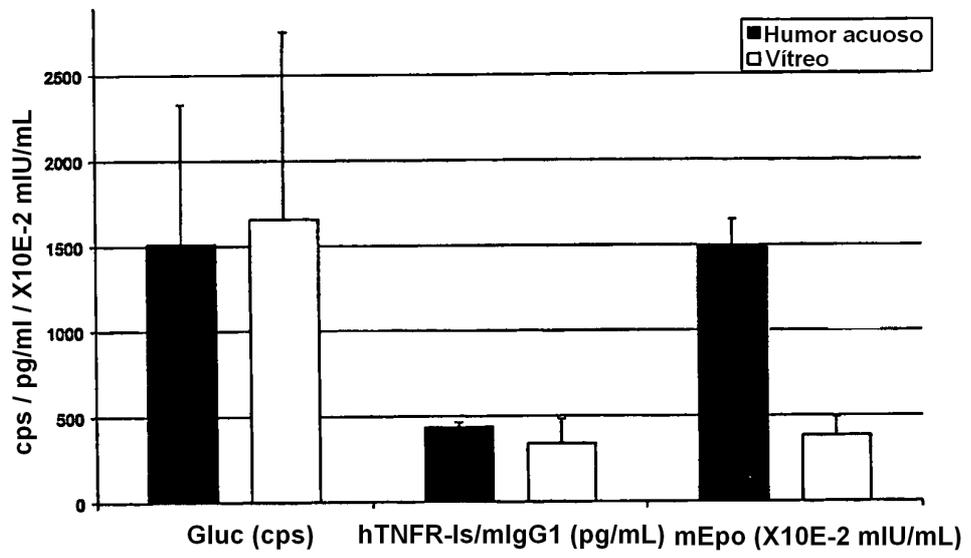


FIGURA 12

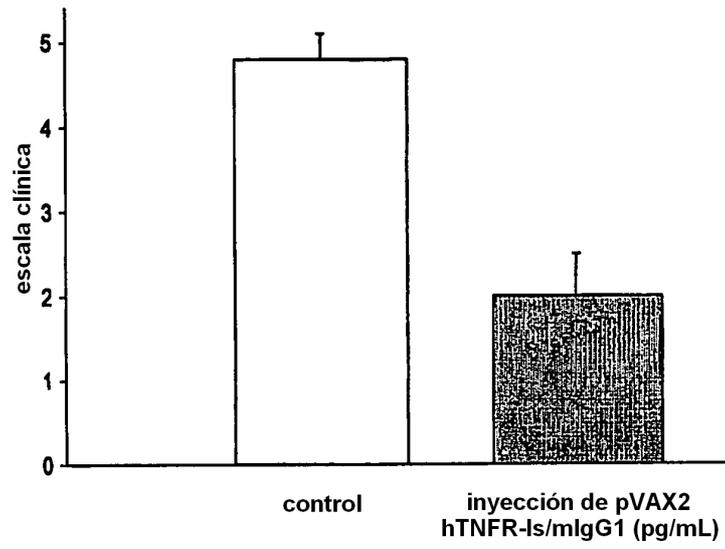


FIGURA 13

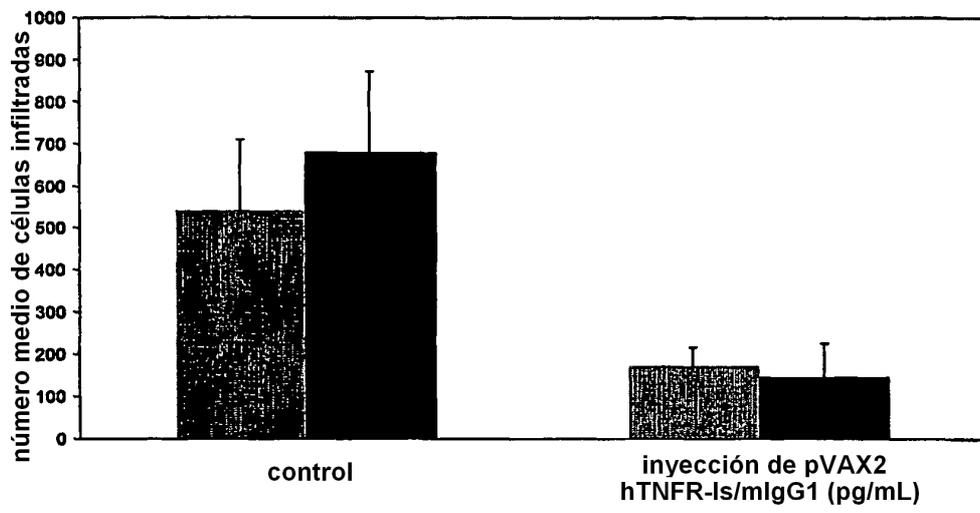


FIGURA 14

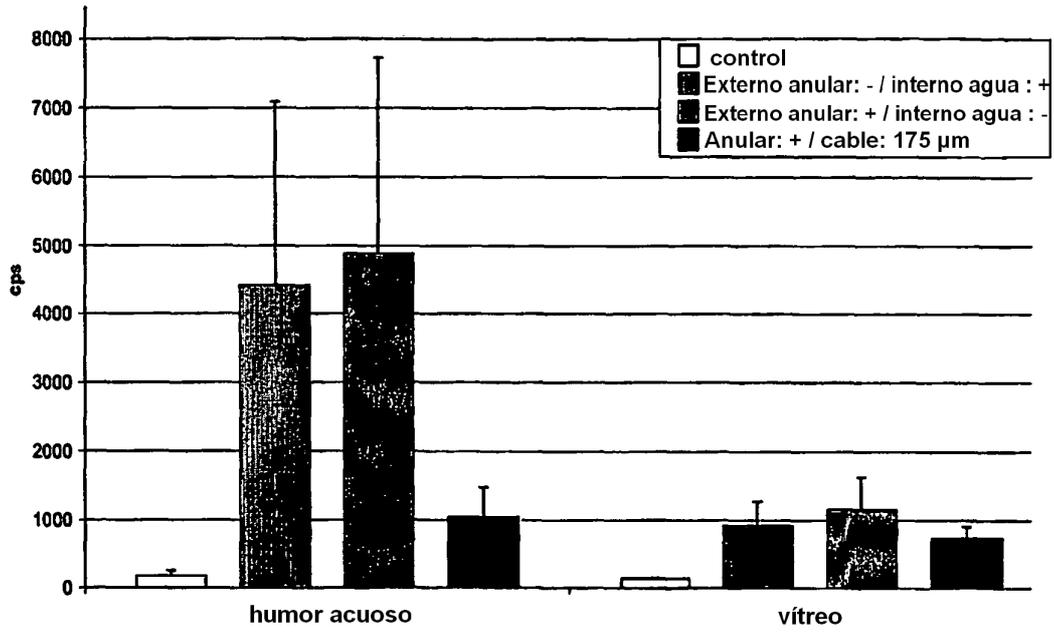


FIGURA 15

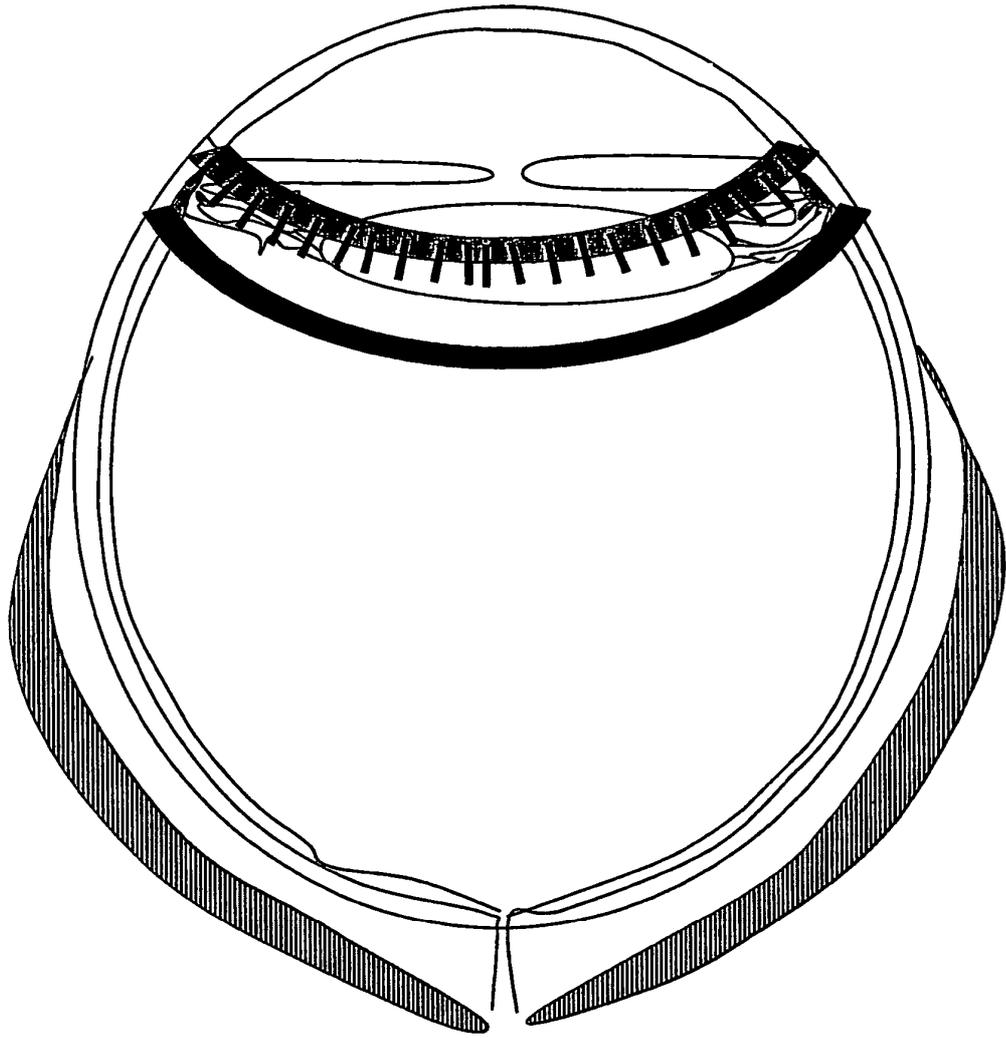


Figura 16