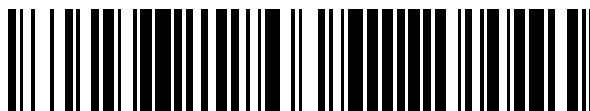


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 796 737**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2013 PCT/EP2013/071728**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.04.2014 WO14060517**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2013 E 13777084 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 2909232**

54 Título: **Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD)**

30 Prioridad:

17.10.2012 EP 12306278

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

30.11.2020

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LEVEILLARD, THIERRY;
SAHEL, JOSÉ-ALAIN;
CRONIN, THÉRÈSE;
BYRNE, LEAH y
FRIDLICH, RAM**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 796 737 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

Métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD)

Sector de la técnica

La presente invención se refiere a métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD).

Estado de la técnica

El aumento del estrés oxidativo se ha implicado en la patogénesis de muchas enfermedades diferentes. Como consecuencia del estrés oxidativo, las proteínas, los lípidos y el ADN pueden dañarse, dando como resultado a menudo cambios estructurales. Por ejemplo, cuando los fosfolípidos de membrana experimentan peroxidación lipídica, se generan malondialdehído (MDA) y otros productos de descomposición reactiva. El MDA y sus productos de condensación son marcadores confiables para el estrés oxidativo y se han asociado a muchos trastornos, incluyendo degeneración macular relacionada con la edad (AMD), una enfermedad degenerativa que afecta a la retina y conduce a una pérdida de visión irreversible. La AMD es la principal causa de discapacidad visual en los países occidentales, que afecta a más de 1,5 millones de personas en Francia, ocho millones de personas en los Estados Unidos. La prevalencia estimada de AMD avanzada es solo del 0,2 % a las edades de 55 a 64 años, pero aumenta al 13 % en los mayores de 85 años. Una característica distintiva del desarrollo de AMD es la acumulación de depósitos extracelulares, denominados drusa, que han demostrado contener MDA. En consecuencia, los métodos que pueden conducir a la reducción de malondialdehído (MDA) son muy deseables para el tratamiento de la AMD.

La solicitud internacional WO2002/081513A2 y WO2005/113586A2 describe la identificación de dos factores de viabilidad celular derivados del bastón RdCVF1 y RdCVF2, codificados respectivamente por el gen *Nxn1* y el gen *Nxn2* para el tratamiento de distrofias retinianas, sin distinguir las isoformas cortas y largas.

Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un polinucleótido o polipéptido de isoforma larga de factor de viabilidad de cono derivado de bastón (RdCVFL) para su uso en un método para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) en un sujeto que lo necesite, reduciendo el nivel de malondialdehído (MDA) en la retina.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, el término "RdCVF" tiene su significado general en la técnica y se refiere al factor de viabilidad del cono derivado de bastón (Leveillard T, Mohand-Said S, Lorentz O, Hicks D, Fintz AC, Clerin E et al. Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. Nat Genet 2004; 36: 755-759.). RdCVF corresponde a una proteína similar a la tioredoxina truncada (TRX) y está codificada por el exón 1 del gen tipo nucleoredoxina 1 (*Nxn1*). Además del ARNm de RdCVF, el gen *Nxn1* produce un segundo ARNm al cortar y empalmar los exones 1 y 2 para producir una isoforma proteica más larga "RdCVFL" que contiene un plegamiento TRX completo. Se puede acceder a una secuencia de aminoácidos representativa de RdCVFL en GenBank con el número de registro Q8VC33.

La presente divulgación se refiere al uso, a métodos y a composiciones farmacéuticas para tratar o prevenir la degeneración macular relacionada con la edad.

En particular, La terapia génica es una forma particularmente conveniente de tratar la degeneración macular relacionada con la edad, ya que permite la provisión de un suministro constante de un polipéptido.

De esta manera la presente divulgación se refiere además a un método para tratar o prevenir la degeneración macular relacionada con la edad que comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesita con un polinucleótido RdCVFL, es decir, una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido RdCVFL de tipo silvestre, de manera que RdCVFL se expresa *in vivo* por las células del sujeto que se han transfectado con dicho polinucleótido. En consecuencia, dicho método conduce a una sobreexpresión de RdCVF de tipo silvestre.

La presente invención se refiere a un polinucleótido o polipéptido de isoforma larga de factor de viabilidad de cono derivado de bastón (RdCVFL) para su uso en un método para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) en un sujeto que lo necesite, reduciendo el nivel de malondialdehído (MDA) en la retina.

En una realización, la secuencia de polinucleótidos de RdCVFL de acuerdo con la invención está asociada a elementos que permiten la regulación de su expresión. En una realización particular, dichos elementos que permiten la regulación de su expresión comprenden una secuencia promotora.

En una realización, la secuencia de polinucleótidos de RdCVFL de acuerdo con la invención está en forma de un vector.

5 Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", el cual se refiere a un bucle de ADN bicatenario en el cual pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedadora en la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamífero). Otros vectores (por ejemplo, vectores no episómicos de mamífero) se integran en el genoma de una célula hospedadora tras su introducción en la célula hospedadora y, de este modo, se replican junto con el genoma del hospedador. Por otra parte, determinados vectores, vectores de expresión, son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están con frecuencia en forma de plásmidos (vectores). Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas tales de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus defectuosos para la replicación, adenovirus y virus adenoasociados (AAV)), que tienen funciones equivalentes.

20 En una realización preferida, el vector de expresión es un vector de AAV. Los vectores víricos adenoasociados (AAV) se han convertido en poderosas herramientas de administración de genes para el tratamiento de la degeneración retiniana. Los vectores AAV poseen una serie de características que los hacen ideales para la terapia génica de la retina, incluyendo una falta de patogenicidad, inmunogenicidad mínima y la capacidad de transducir células post-mitóticas de manera estable y eficiente. En el ambiente protegido de la retina, los vectores AAV son capaces de mantener altos niveles de expresión transgénica en el epitelio pigmentado de la retina (RPE), fotorreceptores o células ganglionares durante largos períodos de tiempo después de un solo tratamiento. Cada tipo de célula puede marcarse como diana eligiendo específicamente la combinación apropiada de serotipo AAV, promotor y sitio de inyección intraocular.

30 El polinucleótido RdCVFL puede introducirse en una célula diana mediante cualquier procedimiento conocido para el suministro de ácidos nucleicos al núcleo de las células, *ex vivo*, en células en cultivo o extraídas de un animal o sujeto, o *in vivo*.

35 La introducción *ex vivo* puede realizarse mediante cualquier método convencional bien conocido por un experto en la materia, por ejemplo, transfección, electroporación, iontoforesis, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación de fosfato de calcio o el uso de una pistola genética.

40 El polinucleótido RdCVFL también puede introducirse *ex vivo* o *in vivo* por lipofección. En determinadas realizaciones, se contempla el uso de liposomas y/o nanopartículas para la introducción del sistema de direccionamiento de ácido nucleico del donante en las células hospedadoras.

45 Las nanocápsulas pueden en general inmovilizar compuestos de una manera estable y reproducible. Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, dichas partículas ultrafinas (de un tamaño de alrededor de 0,1 µm) deben diseñarse usando polímeros capaces de degradarse *in vivo*. Se contemplan nanopartículas biodegradables de polialquil-cianoacrilato que cumplen con estos requisitos, y tales partículas pueden fabricarse fácilmente.

50 Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas de bicapas concéntricas multilaminares (denominadas también vesículas multilaminares (MLV)). Las MLV tienen generalmente diámetros desde 25 nm a 4 µm. El sometimiento a ultrasonidos de las MLV da como resultado la formación de pequeñas vesículas unilamelares (SUV) con diámetros en el intervalo de 200 a 500 Å, que contienen una solución acuosa en el núcleo.

55 Los lípidos catiónicos sintéticos diseñados para limitar las dificultades y los peligros encontrados con la transfección mediada por liposomas pueden usarse para preparar liposomas para la transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador. El uso de lípidos catiónicos puede promover la encapsulación de ácidos nucleicos cargados negativamente y también promover la fusión con membranas celulares cargadas negativamente.

60 Como alternativa, el polinucleótido puede inyectarse directamente en el humor vítreo, el acuoso, tejido o tejidos del cuerpo ciliar o células y/o músculos extraoculares por medio de electroporación.

65 Como alternativa, una de las formas más sencillas y seguras de administrar el polinucleótido RdCVFL a través de las membranas celulares *in vivo* puede implicar la aplicación directa de polinucleótidos libres o desnudos de alta concentración (típicamente ARNm o ADN). Por "ADN desnudo (o ARN)" se entiende una molécula de ADN (ARN) que no ha sido previamente complejada con otras fracciones químicas. La absorción de ADN desnudo por las células animales puede aumentarse administrando las células simultáneamente con los excipientes y el ácido nucleico. Tales excipientes son reactivos que aumentan o aumentan la penetración del ADN a través de las

- membranas celulares y, por lo tanto, la administración a las células del agente terapéutico. Se han descrito diversos excipientes en la técnica, tales como tensioactivos, por ejemplo, un tensioactivo seleccionado del grupo que consiste en Triton X-100, dodecilsulfato sódico, Tween 20 y Tween 80; toxinas bacterianas, por ejemplo estreptolisina O, toxina colérica y toxina lábil modificada recombinante de *E. coli*; y polisacáridos, tales como glucosa, sacarosa, fructosa o maltosa, por ejemplo, que actúan interrumpiendo la presión osmótica en la vecindad de la membrana celular. Se han descrito otros métodos para mejorar la administración de polinucleótidos libres, tales como el bloqueo de la inactivación de polinucleótidos mediante escisión endo o exonucleolítica por nucleasas extracelulares e intracelulares.
- 10 Como alternativa, la presente descripción también proporciona un método para tratar o prevenir la degeneración macular relacionada con la edad que comprende la etapa de administrar a un sujeto que lo necesite con un polipéptido RdCVFL de tipo silvestre.
- 15 Conociendo la secuencia de aminoácidos de la secuencia deseada, un experto en la materia puede producir fácilmente dichos polipéptidos, por técnicas convencionales para la producción de polipéptidos. Por ejemplo, pueden sintetizarse usando el bien conocido método de fase sólida, preferentemente usando un aparato de síntesis de péptidos disponible comercialmente (tal como el fabricado por Applied Biosystems, Foster City, California) y siguiendo las instrucciones del fabricante.
- 20 Como alternativa, los polipéptidos pueden sintetizarse mediante técnicas de ADN recombinante como se conoce ahora en la técnica. Por ejemplo, estos fragmentos pueden obtenerse como productos de expresión de ADN después de la incorporación de secuencias de ADN que codifican el (poli)péptido deseado en los vectores de expresión y la introducción de dichos vectores en hospedadores eucariotas o procariotas adecuados que expresarán el polipéptido deseado, de los cuales pueden aislarse posteriormente usando técnicas bien conocidas.
- 25 Los polipéptidos pueden usarse en forma aislada (por ejemplo, purificada) o contenidos en un vector, tales como una membrana o vesícula lipídica (por ejemplo, un liposoma).
- 30 La administración del polipéptido RdCVFL también puede realizarse directamente en el ojo mediante inyección intravítrea.
- El polinucleótido o el polipéptido se administran al sujeto en una cantidad terapéuticamente eficaz. Por "cantidad terapéuticamente eficaz" del polipéptido o el polinucleótido se entiende una cantidad suficiente del polinucleótido del polipéptido para tratar la AMD en una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de los polipéptidos o polinucleótidos se decidirá por el médico especialista dentro del alcance del buen criterio médico. El nivel terapéuticamente específico de dosis eficaz para cualquier sujeto particular dependerá de una diversidad de factores, incluyendo el trastorno que se esté tratando y la gravedad del trastorno; la actividad del polipéptido específico empleado; la composición específica empleada, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración, la ruta de administración y la tasa de excreción del polipéptido específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o coincidentes con el polipéptido específico empleado; y factores similares bien conocidos en la técnica médica. Por ejemplo, está bien dentro de las habilidades del experto en iniciar dosis del compuesto a niveles inferiores que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado.
- 45 Los polipéptidos o polinucleótidos de la invención se combinan típicamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica.
- La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen una reacción alérgica o adversa similar, tales como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano. Preferentemente, como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que se ha aprobado por parte de un organismo de control del gobierno federal o estatal, o que está listada en la Farmacopea de Estados Unidos o en otra farmacopea reconocida de forma general para su uso en animales y, más particularmente, en seres humanos.
- 55 El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Agua o soluciones salinas acuosas y soluciones de dextrosa y glicerol acuosas se emplean preferentemente como vehículos, particularmente para soluciones inyectables. Se describen vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin.
- 60 En una realización particular, el polipéptido o polinucleótido RdCVFL de la invención puede administrarse en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de tal manera que el polipéptido pueda penetrar las regiones corneales e internas del ojo, tales como por ejemplo, la cámara anterior, la cámara posterior, el cuerpo vítreo, el humor acuoso, el humor vítreo, la córnea, el iris/cuerpo ciliar, el cristalino, la coroides/retina y esclerótica.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos y figuras no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

5 **Figuras:**

La Figura 1 muestra los niveles de peroxidación lipídica por producto malondialdehído (MDA) en retinas *rd10* tratadas con vectores PBS o AAV que comprenden un polinucleótido que codifica RdCVFL, un polinucleótido que codifica RdCVF o un polinucleótido que codifica GFP.

10

Ejemplo:

Un ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Okawa, H., Ohishi, N. y Yagi, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 95 351-358 (1979)). se usó para determinar los niveles de la peroxidación lipídica por producto malondialdehído (MDA) en retinas *rd10* tratadas con vectores PBS o AAV que comprenden un polinucleótido que codifica RdCVFL, un polinucleótido que codifica RdCVF o un polinucleótido que codifica GFP. La prueba se realizó en tres retinas agrupadas y se repitió tres veces. Se muestra un ensayo representativo (Figura 1). Los niveles de MDA disminuyeron un 18 % $\pm$ 0,9 % en ojos tratados con RdCVFL en comparación con ojos sin tratar. En consecuencia, el uso de RdCVFL podría ser adecuado para el tratamiento de AMD en donde la acumulación de MDA representa una causa de la enfermedad.

15

20

Referencias:

A lo largo de la presente solicitud, diversas referencias describen el estado de la técnica al que pertenece esta invención.

25

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido o polipéptido de isoforma larga de factor de viabilidad derivado de bastón (RdCVFL) para su uso en un método para el tratamiento de la degeneración macular relacionada con la edad (AMD) en un sujeto que lo necesite, reduciendo el nivel de malondialdehído (MDA) en la retina.
5
2. El polinucleótido de RdCVFL para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia de polinucleótido de RdCVFL está asociada a elementos que permiten la regulación de su expresión.
- 10 3. El polinucleótido de RdCVFL para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en donde los elementos que permiten la regulación de su expresión comprenden una secuencia promotora.
4. El polinucleótido de RdCVFL para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde la secuencia de polinucleótido de RdCVFL está en forma de un vector.
15
5. El polinucleótido de RdCVFL para uso de acuerdo con la reivindicación 4 en donde el vector es un vector AAV.
6. El polinucleótido o polipéptido de RdCVFL para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde el polinucleótido o polipéptido de RdCVFL se administra en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable.
20

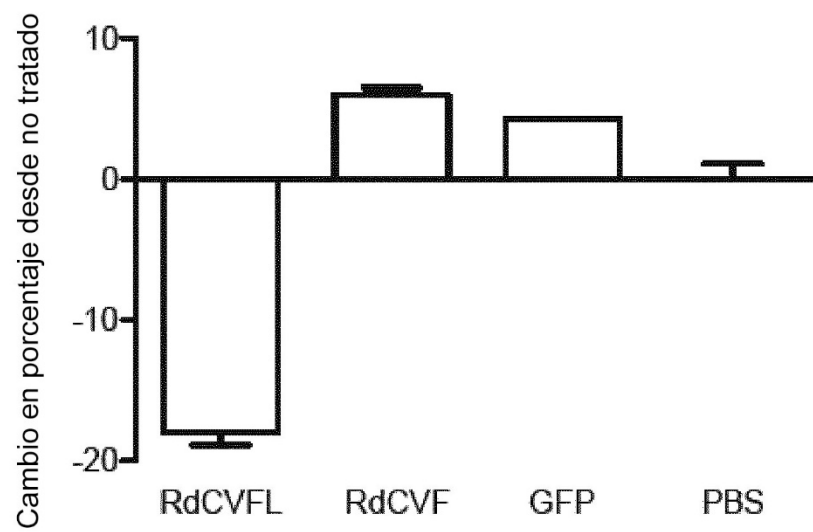


Figura 1