

**COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA TRATAR O PREVENIR LA
TAQUICARDIA VENTRICULAR POLIMÓRFICA CATECOLAMINÉRGICA**

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud es una Solicitud Internacional que asignó Estados Unidos, y que reclama el beneficio bajo 35 USC § 119(e) de la Solicitud Provisional de Estados Unidos No. 62/529,256 presentada el 6 de julio de 2017, cuyo contenido se incorpora en la presente como referencia en su totalidad.

DECLARACIÓN DE DERECHOS A LAS INVENCIONES HECHAS BAJO

10 INVESTIGACIÓN PATROCINADA FEDERALMENTE

 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo la Subvención No.: NIH U01 HL100401 y UG3 TR002145 otorgadas por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

 La taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) es una afección caracterizada por un ritmo cardíaco anormal, que afecta a una de cada diez mil personas. Los síntomas de la CPVT incluyen mareos o desmayos asociados con el ejercicio o el estrés emocional. Los episodios de taquicardia ventricular pueden hacer que el corazón deje de latir
20 de manera efectiva (paro cardíaco), lo que lleva a la muerte súbita en niños y adultos jóvenes sin anomalías cardíacas reconocidas. Los tratamientos para la CPVT incluyen restricción del ejercicio, el uso de betabloqueantes y desfibriladores automáticos implantables. Otros tratamientos son la simpatectomía quirúrgica y el tratamiento con flecainida. Desafortunadamente, estos tratamientos no son efectivos para todos los pacientes y están
25 limitados por el cumplimiento del paciente, los efectos secundarios de la medicación, o el riesgo de eventos adversos tal como exabruptos eléctricos fatales causados por los desfibriladores implantables.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

 Las modalidades de la descripción en la presente se basan, en parte, en el
30 descubrimiento de que la inhibición de la activación de CaMKII y la subsecuente señalización en fases posteriores reduce significativamente la arritmia latente estimulada por la

catecolamina que está asociada con mutaciones en el canal de rianodina de calcio, RYR2. En experimentos *in vivo*, los inventores demostraron que el inhibidor de péptidos, AIP, cuando se expresa *in vivo* en tejidos cardíacos de ratones modelo CPVT, inhibía la arritmia en los ratones. Ver el Ejemplo 2, FIGS. 17 y 18. Los inventores también encontraron que la fosforilación mediada por CaMKII del residuo de serina en S2814 en el RYR2 es esencial para la arritmia latente estimulada por catecolamina en mutaciones de la CPVT. La mutación de la serina en alanina revierte la frecuencia anómala de chispas de Ca^{2+} registrada en células cardíacas que tienen mutaciones asociadas a CPVT en la proteína RYR2.

De acuerdo con esto, como se describe a continuación, la presente invención exhibe péptidos inhibidores de la cinasa II dependiente de la Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII) incluyendo el péptido inhibidor relacionado con la autocalmodulina-2 (AIP) y péptidos relacionados, y CaMKNTida y polipéptidos relacionados (tal como CN190), y composiciones de polinucleótidos relacionados, y métodos para usar tales composiciones para el tratamiento de la CPVT. La invención proporciona además cardiomiocitos de células madre pluripotentes inducidas por CPVT (iPSC-CM) y métodos para usar los mismos para caracterizar agentes para el tratamiento de la CPVT.

En un aspecto, esta descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un vector que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII.

En un aspecto, se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un vector que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII para usarse en el tratamiento de la arritmia cardíaca, por ejemplo, tal como la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT).

En un aspecto, se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un vector que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII para usarse en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de arritmia cardíaca, por ejemplo, tal como CPVT.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII.

En un aspecto, se proporciona en la presente un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII para usarse en el

tratamiento de la arritmia cardíaca, por ejemplo, tal como la CPVT.

En un aspecto, se proporciona en la presente un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII para usarse en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de la arritmia cardíaca, por ejemplo, tal como la CPVT.

En otro aspecto, se proporciona en la presente una célula que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII.

En un aspecto, se proporciona en la presente una célula que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII para usarse en el tratamiento de la arritmia cardíaca, por ejemplo, tal como la CPVT.

En un aspecto, se proporciona en la presente una célula que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII para usarse en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de la arritmia cardíaca, por ejemplo, tal como la CPVT.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para modular la arritmia cardíaca en un sujeto, el método comprende poner en contacto una célula que comprende un canal de rianodina cardíaca (RyR2) con un inhibidor de CaMKII, inhibidor del péptido de CaMKII o polinucleótido que codifica el inhibidor del péptido de CaMKII.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para inhibir la fosforilación de un polipéptido del canal de rianodina (RyR2) en un sujeto, el método comprende poner en contacto una célula que comprende un canal de rianodina cardíaca (RyR2) con un inhibidor de CaMKII, un inhibidor del péptido de CaMKII o polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para tratar un sujeto que comprende una mutación asociada con una arritmia cardíaca, el método comprende administrar al sujeto un inhibidor de CaMKII, inhibidor del péptido de CaMKII, análogo, o fragmento del mismo o un polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para caracterizar un cardiomiocito, el método comprende monitorear la conducción o contracción cardíaca, o monitorear la arritmia cardíaca usando un cardiomiocito derivado de células madre pluripotentes inducidas, que expresa un canal de rianodina cardíaca (RyR2) que comprende

una mutación asociada con la CPVT.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un método de detección selectiva de compuestos, el método comprende poner en contacto un cardiomiocito derivado de células madre pluripotentes inducidas, que expresa un canal de rianodina cardíaca (RYR2) que comprende una mutación asociada con la CPVT con un agente candidato y medir la conducción o contracción cardíaca en la célula.

En una modalidad de cualquier aspecto descrito, el inhibidor del péptido de CaMKII es AIP, CN19, CN19o, CN27, CN21, o un análogo o fragmento de los mismos.

En una modalidad de cualquier aspecto descrito o de cualquiera de las modalidades anteriores, el inhibidor del péptido de CaMKII está operativamente unido a un promotor adecuado para dirigir la expresión del péptido en una célula cardíaca de mamífero.

En una modalidad de cualquier aspecto descrito o de cualquiera de las modalidades anteriores, el vector es una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un inhibidor del péptido de CaMKII, análogo o fragmento del mismo.

En una modalidad de cualquier aspecto descrito o de cualquiera de las modalidades anteriores, el vector es un vector viral retroviral, adenoviral o adeno-asociado.

En una modalidad de cualquier aspecto descrito o de cualquiera de las modalidades anteriores, la mutación está en un canal de rianodina cardíaca (RYR2).

En una modalidad de cualquiera aspecto descrito o de cualquiera de las modalidades anteriores, la mutación se selecciona del grupo que consiste en RYR2^{R4651I}, RYR2^{R176Q}, RYR2^{D385N}, RYR2^{S404R} y RYR2^{G3946S}.

En una modalidad de cualquier aspecto descrito o de cualquiera de las modalidades anteriores, el método inhibe una arritmia cardíaca.

En una modalidad de cualquier aspecto descrito o de cualquiera de las modalidades anteriores, el método inhibe la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica en el sujeto.

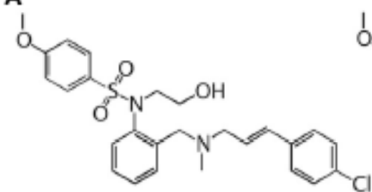
Las composiciones y artículos definidos por la invención se aislaron o se fabricaron de otro modo en relación con los ejemplos proporcionados a continuación. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y de las reivindicaciones.

Definiciones

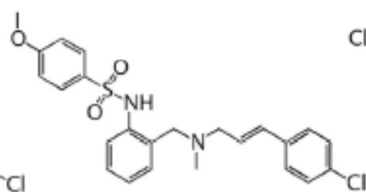
A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a los expertos una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2a ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Ed. Walker, 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Cuando se usan en la presente, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a continuación, a menos que se especifique lo contrario.

Por “Péptido inhibidor relacionado con autocalcitrina-2 (AIP)”, se entiende un péptido o fragmento del mismo que comprende al menos aproximadamente 9-13 aminoácidos de KKALRRQEAVDAL (SEQ. ID. NO: 1) y que tiene actividad reguladora cardíaca y/o actividad inhibidora de CAMKII. En una modalidad, el péptido AIP comprende una o más alteraciones en la secuencia de péptidos. En una modalidad, el péptido AIP consiste esencialmente de la SEQ. ID. NO: 1. En otra modalidad, el péptido AIP consiste de la SEQ. ID. NO: 1 o consiste de aproximadamente 9-13 aminoácidos contiguos de la SEQ. ID. NO: 1. En una modalidad, el péptido AIP consiste esencialmente de la SEQ. ID. NO: 1 o consiste en esencia de aproximadamente 9-13 aminoácidos contiguos de la SEQ. ID. NO: 1. En otra modalidad, el péptido AIP comprende uno o más aminoácidos modificados.

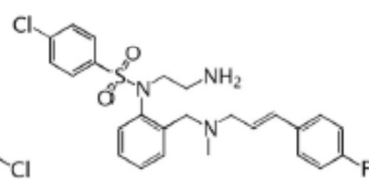
Por “inhibidor de CAMKII” se entiende un péptido o molécula pequeña que inhibe la actividad de CAMKII. Los inhibidores de ejemplo son conocidos en la técnica (por ejemplo, AIP, CN19, CN27, CN19o, CN21) y se describen, por ejemplo, por Coultrap et al., PLOS One e25245, Vol 6, Issue 10, 2011 y Pellicena et al., Frontiers in Pharmacology 21:1-20, 2014. Otros inhibidores incluyen, los siguientes:

A

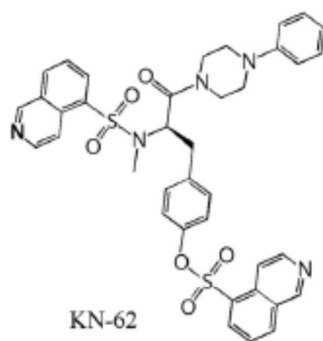
KN-93



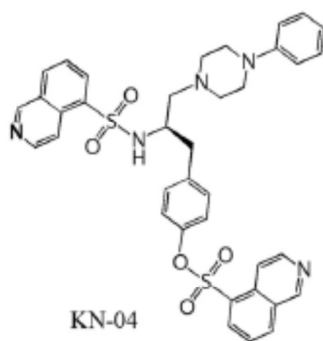
KN-92



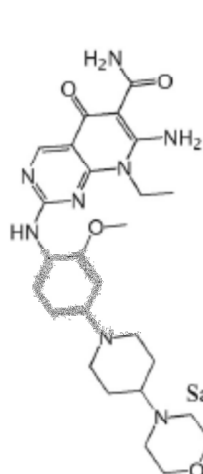
HMN-709



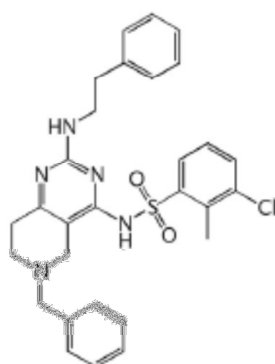
KN-62



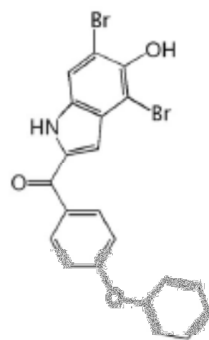
KN-04



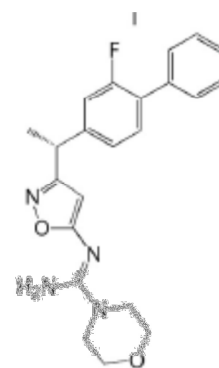
Sanofi-32



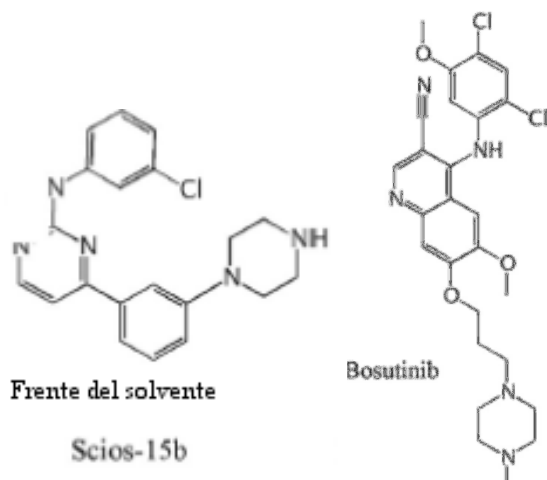
Dainippon A: 8p



Dainippon B: 25



Rimacalib; SMP-114



Por “polinucleótido AIP” se entiende un polinucleótido que codifica un péptido AIP.

Por “agente” se entiende un péptido, polipéptido, molécula de ácido nucleico o compuesto pequeño.

5 Por “mejorar” se entiende disminuir, suprimir, atenuar, aminorar, detener o estabilizar el desarrollo o avance de una enfermedad.

Por “alteración” en un péptido AIP se entiende un cambio en la secuencia de aminoácidos del péptido AIP.

Por ejemplo, un análogo de polinucleótido retiene la actividad biológica de un correspondiente polipéptido de origen natural, al mismo tiempo que tiene ciertas modificaciones bioquímicas que mejoran la función del análogo en relación con un polinucleótido presente de manera natural. Tales modificaciones bioquímicas podrían aumentar la resistencia a la nucleasa del análogo, la permeabilidad de la membrana o la vida media, sin alterar, por ejemplo, la actividad funcional, como su función de codificación de proteínas. Un análogo puede incluir una molécula de ácido nucleico modificada.

El término “cardiomiocito” cuando se usa en la presente se refiere ampliamente a una célula muscular del corazón. En una modalidad, una célula cardíaca de mamífero es un cardiomiocito. En otra modalidad, un cardiomiocito que se diferencia de una célula madre pluripotente inducida es un cardiomiocito.

20 Cuando se usa en la presente, la frase “afección, enfermedad o trastorno cardiovascular” se pretende incluir todos los trastornos caracterizados por una función cardíaca insuficiente, no deseada o anormal, por ejemplo, enfermedad cardíaca isquémica,

arritmia cardíaca, enfermedad cardíaca hipertensiva y enfermedad cardíaca hipertensiva pulmonar, enfermedad valvular, enfermedad cardíaca congénita y cualquier condición que conduzca a insuficiencia cardíaca congestiva en un sujeto, particularmente un sujeto humano. La función cardíaca insuficiente o anormal puede ser el resultado de una enfermedad, lesión, mutaciones genéticas y/o envejecimiento. A modo de antecedentes, una respuesta a la lesión miocárdica sigue un curso bien definido en el que algunas células mueren mientras que otras entran en un estado de hibernación en el que aún no están muertas, pero son disfuncionales. Esto es seguido por la infiltración de células inflamatorias, la deposición de colágeno como parte de la cicatrización, todo lo cual ocurre en paralelo con el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y un grado de muerte celular continua.

El término “cantidad efectiva”, cuando se usa en la presente, se refiere a la cantidad de agente terapéutico de la composición farmacéutica, por ejemplo, para expresar una cantidad suficiente de la proteína para reducir al menos uno o más síntoma(s) de la enfermedad o trastorno, y se refiere a una cantidad suficiente de composición farmacológica para proporcionar el efecto deseado. La frase “cantidad terapéuticamente efectiva” cuando se usa en la presente, por ejemplo, de un péptido AIP que se da a conocer en la presente significa una cantidad suficiente de la composición para tratar un trastorno, a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. Por lo tanto, el término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de la composición que se da a conocer en la presente que es suficiente para, por ejemplo, efectuar una reducción terapéutica o profilácticamente significativa en un síntoma o marcador clínico asociado con una disfunción o trastorno cardíaco cuando se administra a un sujeto típico que tiene una afección, enfermedad o trastorno cardiovascular.

Con referencia al tratamiento de, por ejemplo, una afección o enfermedad cardiovascular en un sujeto, el término “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad que es segura y suficiente para prevenir o retrasar el desarrollo o una enfermedad o trastorno cardiovascular (por ejemplo, arritmia cardíaca). La cantidad puede por consiguiente curar o hacer que se suprima la arritmia, o hacer que la enfermedad o trastorno cardiovascular entre en remisión, retrasar el curso del avance de la enfermedad cardiovascular, retrasar o inhibir un síntoma de una enfermedad o trastorno cardiovascular, retrasar o inhibir el establecimiento de los síntomas secundarios de una enfermedad o trastorno cardiovascular o

inhibir el desarrollo de un síntoma secundario de una enfermedad o trastorno cardiovascular. La cantidad efectiva para el tratamiento de la enfermedad o trastorno cardiovascular depende del tipo de enfermedad cardiovascular a tratar, la gravedad de los síntomas, el sujeto a tratar, la edad y el estado general del sujeto, el modo de administración, etc. Por lo tanto, no es posible

5 especificar la “cantidad efectiva” exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, un experto en la técnica puede determinar una “cantidad efectiva” apropiada usando solo experimentación de rutina. La eficacia del tratamiento puede ser evaluada por un profesional normalmente capacitado, por ejemplo, la eficacia puede evaluarse en modelos animales de una enfermedad o trastorno cardiovascular como se aborda en la presente, por ejemplo, el tratamiento de un

10 roedor con infarto agudo al miocardio o lesión por isquemia-reperusión, y cualquier tratamiento o administración de las composiciones o formulaciones que conduzca a una disminución de al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno cardiovascular como se da a conocer en la presente, por ejemplo, aumento de la fracción de eyección del corazón, disminución del índice de insuficiencia cardíaca, disminución del tamaño del infarto,

15 disminución de la morbilidad asociada (edema pulmonar, insuficiencia renal, arritmias) mejora de la tolerancia al ejercicio u otras medidas de calidad de vida, y la disminución de la mortalidad indica un tratamiento efectivo. En las modalidades donde las composiciones se usan para el tratamiento de una enfermedad o trastorno cardiovascular, la eficacia de la composición se puede evaluar usando un modelo animal experimental de enfermedad

20 cardiovascular, por ejemplo, modelos animales de lesión por isquemia-reperusión (Headrick J P, Am J Physiol Heart circ Physiol 285; H1797; 2003) y modelos animales con infarto agudo al miocardio. (Yang Z, Am J Physiol Heart Circ. Physiol 282: H949: 2002; Guo Y, J Mol Cell Cardiol 33; 825-830, 2001). Cuando se usa un modelo animal experimental, la eficacia del tratamiento se evidencia cuando una reducción en un síntoma de la enfermedad o trastorno

25 cardiovascular, por ejemplo, una reducción en uno o más síntomas de disnea, dolor de pecho, palpitaciones, mareos, síncope, edema, cianosis, palidez, fatiga y presión arterial alta que ocurre antes en animales tratados versus no tratados.

Los sujetos susceptibles de tratamiento por los métodos que se dan a conocer en la presente pueden identificarse por cualquier método para diagnosticar arritmia cardíaca. Los

30 métodos para diagnosticar estas afecciones son bien conocidos por los expertos en la técnica. A modo de ejemplo no limitativo, la arritmia cardíaca se puede diagnosticar mediante un

electrocardiograma (ECG o EKG), que es un registro gráfico de la actividad cardíaca, ya sea en papel o en un monitor de computadora.

Los términos “enfermedad de la arteria coronaria” y “síndrome coronario agudo”, cuando se usan indistintamente en la presente, y se refieren a infarto al miocardio se refieren a una afección, enfermedad o trastorno cardiovascular, incluyendo todos los trastornos caracterizados por una función cardíaca insuficiente, no deseada o anormal, por ejemplo, enfermedad cardíaca isquémica, enfermedad cardíaca hipertensiva y enfermedad cardíaca hipertensiva pulmonar, enfermedad valvular, enfermedad cardíaca congénita y cualquier afección que conduzca a insuficiencia cardíaca congestiva en un sujeto, particularmente un sujeto humano. La función cardíaca insuficiente o anormal puede ser el resultado de una enfermedad, lesión y/o envejecimiento. A modo de antecedentes, una respuesta a la lesión al miocardio sigue un curso bien definido en el que algunas células mueren mientras que otras entran en un estado de hibernación en el que aún no están muertas, pero son disfuncionales. Esto es seguido por la infiltración de células inflamatorias, la deposición de colágeno como parte de la cicatrización, todo lo cual ocurre en paralelo con el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y un grado de muerte celular continua.

En esta descripción, “comprende”, “que comprende”, “que contiene” y “que tiene” y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la Ley de patentes de los Estados Unidos y pueden significar “incluye”, “que incluye” y similares; “que consiste esencialmente de” o “consiste esencialmente” también tiene el significado atribuido en la Ley de patentes de Estados Unidos y el término es abierto, lo que permite la presencia de más de lo que se recita siempre que las características básicas o novedosas de lo que se recita no sea cambiado por la presencia de más de lo que se recita, aunque excluye las modalidades de la técnica anterior.

Por “fragmento” se entiende una porción de un polipéptido o molécula de ácido nucleico. Esta porción contiene, preferiblemente, al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de la longitud total de la molécula o polipéptido de ácido nucleico de referencia. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 o 1000 nucleótidos o aminoácidos.

“Hibridación” significa enlace de hidrógeno, que puede ser un enlace de hidrógeno de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido, entre nucleobases complementarias. Por ejemplo, la adenina y la timina son nucleobases complementarias que se emparejan a través de

la formación de enlaces de hidrógeno.

Los términos “aislado”, “purificado” o “biológicamente puro” se refieren al material que está libre en diversos grados de componentes que normalmente acompañan al mismo cuando se encuentra en su estado natural o nativo. “Aislar” denota un grado de separación de la fuente original o sus alrededores. “Purificar” denota un grado de separación que es mayor que el aislamiento. Una proteína “purificada” o “biológicamente pura” está suficientemente libre de otros materiales de manera que las impurezas no afecten materialmente las propiedades biológicas de la proteína ni causen otras consecuencias adversas. Es decir, un ácido nucleico o péptido de esta invención está purificado si el mismo está sustancialmente libre de material celular, material viral o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La pureza y la homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alta resolución. El término “purificado” puede denotar que un ácido nucleico o proteína da lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético. Para una proteína que puede someterse a modificaciones, por ejemplo, fosforilación o glucosilación, diferentes modificaciones pueden dar lugar a diferentes proteínas aisladas, que pueden purificarse por separado.

Por “polinucleótido aislado” se entiende un ácido nucleico (por ejemplo, un ADN) que está libre de los genes que, en el genoma natural del organismo del que se deriva la molécula de ácido nucleico de la invención, flanquean el gen. Por lo tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector; en un plásmido o virus que se replica de forma autónoma; o en el ADN genómico de un procariota o eucariota; o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido por PCR o digestión con endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias. Además, el término incluye una molécula de ARN que se transcribe de una molécula de ADN, así como un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica una secuencia de polipéptidos adicional.

Por “polipéptido aislado” se entiende un polipéptido de la invención que se ha separado de los componentes que acompañan al mismo de manera natural. Típicamente, el polipéptido se aísla cuando está al menos 60%, en peso, libre de proteínas y moléculas

orgánicas presentes de manera natural con las que está asociado de manera natural. Preferiblemente, la preparación es al menos 75%, de manera más preferible de al menos 90%, y aún más preferiblemente al menos 99%, en peso, de un polipéptido de la invención. Se puede obtener un polipéptido aislado de la invención, por ejemplo, mediante la extracción de una fuente natural, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifique dicho polipéptido; o sintetizando químicamente la proteína. La pureza puede medirse mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o mediante análisis por HPLC.

Cuando se usa en la presente, “obtener” como en “obtener un agente” incluye sintetizar, comprar, o adquirir de otro modo el agente.

Por “reduce” en el contexto de la arritmia cardíaca descrita en la presente o en el contexto de los síntomas, se entiende una reducción de al menos 1%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 25%, al menos 50%, al menos 75%, o al menos el 100% de las incidencias de arritmia o síntomas, o la gravedad de los síntomas, incluidos los porcentajes en números enteros del 1% al 100%.

Una “secuencia de referencia” es una secuencia definida utilizada como base para la comparación de secuencias. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, un segmento de una secuencia de ADNc o gen de longitud completa, o la secuencia completa de ADNc o gen. Para los polipéptidos, la longitud de la secuencia de polipéptidos de referencia será generalmente de al menos aproximadamente 16 aminoácidos, de manera preferible de al menos aproximadamente 20 aminoácidos, de más manera preferible de al menos aproximadamente 25 aminoácidos e incluso de manera más preferible de aproximadamente 35 aminoácidos, de manera aproximada 50 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos. Para los ácidos nucleicos, la longitud de la secuencia de ácido nucleico de referencia será generalmente de al menos aproximadamente 50 nucleótidos, manera preferible de al menos aproximadamente 60 nucleótidos, manera más preferible de al menos aproximadamente 75 nucleótidos, e incluso manera más preferible de aproximadamente 100 nucleótidos o aproximadamente 300 nucleótidos o cualquier número entero de manera aproximada o entre los mismos. En una modalidad, un péptido AIP de referencia es KKALRRQEAVDAL (SEQ. ID. NO: 1).

Las moléculas de ácido nucleico útiles en los métodos de la invención incluyen

cualquier molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido de la invención o un fragmento del mismo. Tales moléculas de ácido nucleico no necesitan ser 100% idénticas a una secuencia de ácido nucleico endógeno, aunque típicamente exhibirán una identidad sustancial. Los polinucleótidos que tienen “identidad sustancial” con una secuencia endógena son típicamente capaces de hibridarse con al menos una hebra de una molécula de ácido nucleico de doble hebra. Las moléculas de ácido nucleico útiles en los métodos de la invención incluyen cualquier molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido de la invención o un fragmento del mismo. Tales moléculas de ácido nucleico no necesitan ser 100% idénticas a una secuencia de ácido nucleico endógeno, aunque exhibirán típicamente una identidad sustancial. Los polinucleótidos que tienen “identidad sustancial” con una secuencia endógena son típicamente capaces de hibridarse con al menos una hebra de una molécula de ácido nucleico de doble hebra. Por “hibridar” se entiende emparejarse para formar una molécula de doble hebra entre secuencias de polinucleótidos complementarias (por ejemplo, un gen descrito en la presente), o porciones de las mismas, bajo diversas condiciones de rigurosidad. (Ver, por ejemplo, Wahl, G. M. y S. L. Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:399; Kimmel, A. R. (1987) *Methods Enzymol.* 152:507).

Por ejemplo, una concentración de sal estricta normalmente será menor que aproximadamente NaCl 750 mM y citrato trisódico 75 mM, de manera preferible menor que aproximadamente NaCl 500 mM y citrato trisódico 50 mM, y de manera más preferible menor que aproximadamente NaCl 250 mM y citrato trisódico 25 mM. La hibridación de baja rigurosidad se puede obtener en ausencia de solvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que una hibridación de alta rigurosidad se puede obtener en presencia de al menos aproximadamente 35% de formamida, y de manera más preferible al menos aproximadamente 50% de formamida. Las condiciones de temperatura estrictas normalmente incluirán temperaturas de al menos aproximadamente 30°C, de manera más preferible de al menos aproximadamente 37°C, y de manera aún más preferible de al menos aproximadamente 42°C. Los parámetros adicionales variables, tales como el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, el dodecil-sulfato de sodio (SDS) y la inclusión o exclusión de ADN portador son bien conocidos por aquellos expertos en la materia. Se logran varios niveles de rigurosidad combinando estas diversas condiciones cuando es necesario. En una modalidad preferida, la hibridación se producirá a 30°C en NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM y SDS

al 1%. En una modalidad más preferida, la hibridación se producirá a 37°C en NaCl 500 mM, citrato trisódico 50 mM, SDS al 1%, formamida al 35% y ADN de esperma de salmón desnaturalizado (ADNss) 100 µg/ml. En una modalidad aún más preferida, la hibridación se producirá a 42°C en NaCl 250 mM, citrato trisódico 25 mM, SDS al 1%, formamida al 50% y ADNss 200 µg/ml. Las variaciones útiles en estas condiciones serán fácilmente evidentes para aquellos expertos en la técnica.

Para la mayoría de las aplicaciones, las etapas de lavado que siguen a la hibridación también varían en rigurosidad. Las condiciones rigurosas de lavado se pueden definir por la concentración de sal y por la temperatura. Como anteriormente, la rigurosidad del lavado se puede aumentar disminuyendo la concentración de sal o aumentando la temperatura. Por ejemplo, una concentración de sal rigurosa para las etapas de lavado será de manera preferible menor que aproximadamente NaCl 30 mM y citrato trisódico 3 mM, y de manera aún más preferible menor que aproximadamente NaCl 15 mM y citrato trisódico 1.5 mM. Las condiciones de temperatura rigurosas para las etapas de lavado incluirán normalmente una temperatura de al menos aproximadamente 25°C, de manera más preferible de al menos aproximadamente 42°C, e incluso de manera más preferible de al menos aproximadamente 68°C. En una modalidad preferida, las etapas de lavado se producirán a 25°C en NaCl 30 mM, citrato trisódico 3 mM y SDS al 0.1%. En una modalidad más preferida, las etapas de lavado se producirán a 42°C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1.5 mM y SDS al 0.1%. En una modalidad más preferida, las etapas de lavado se producirán a 68°C en NaCl 15 mM, citrato trisódico 1.5 mM y SDS al 0.1%. Las variaciones adicionales en estas condiciones serán fácilmente evidentes para aquellos expertos en la técnica. Las técnicas de hibridación son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Benton y Davis (Science 196:180, 1977); Grunstein y Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci., EUA 72:3961, 1975); Ausubel et al. (Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience, Nueva York, 2001); Berger y Kimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques, 1987, Academic Press, Nueva York); y Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York.

Por “sustancialmente idéntico” se entiende un polipéptido o una molécula de ácido nucleico que exhibe al menos un 50% de identidad con una secuencia de aminoácidos de referencia (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente)

o una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, cualquiera de las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente). Preferiblemente, tal secuencia es al menos 60%, más preferiblemente 80% u 85%, y aún más preferiblemente 90%, 95% o incluso 99% idéntica a nivel de aminoácidos o ácido nucleico a la secuencia utilizada para la comparación.

5 La identidad de secuencia se mide típicamente usando un software de análisis de secuencia (por ejemplo, el Paquete de Software de Análisis de Secuencia de Genetics Computer Group, los programas BLAST, BESTFIT, GAP o PILEUP/PRETTYBOX del Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, 1710 University Avenue, Madison, Wis. 53705). Tal software examina secuencias idénticas o similares mediante la asignación de
10 grados de homología a varias sustituciones, eliminaciones y/u otras modificaciones. Las sustituciones conservativas típicamente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina; y fenilalanina, tirosina. En un enfoque ejemplar para determinar el grado de identidad, se puede usar el programa BLAST, con una puntuación
15 de probabilidad entre e^{-3} y e^{-100} que indica una secuencia estrechamente relacionada.

Cuando se usa en la presente, el término “modular” se refiere a regular o ajustar hasta un cierto grado.

Cuando se utilizan en la presente, los términos “farmacéuticamente aceptables”, “fisiológicamente tolerables” y las variaciones gramaticales de los mismos, ya que los mismos
20 se refieren a composiciones, portadores, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan que los materiales son capaces de administrarse a o en un mamífero sin la producción de efectos fisiológicos indeseables tales como náuseas, mareos, malestar gástrico y similares. Un portador farmacéuticamente aceptable no propiciará el aumento de una respuesta inmune a un agente con el que el mismo se mezcla, a menos que se desee. La preparación de
25 una composición farmacológica que contiene ingredientes activos disueltos o dispersados en la misma se entiende bien en la técnica y no necesita limitarse en base a la formulación. Típicamente, tales composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas, sin embargo, también se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensiones, en líquido antes de usarse. La preparación también se puede
30 emulsionar o presentar como una composición de liposomas. El ingrediente activo se puede mezclar con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el

ingrediente activo y en cantidades adecuadas para su uso en los métodos terapéuticos descritos en la presente. Los excipientes adecuados incluyen, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes amortiguadores de pH y similares que mejoren la efectividad del ingrediente activo. La composición terapéutica de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes de la misma. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína y similares. Los portadores fisiológicamente tolerables son bien conocidos en la técnica. Los portadores líquidos de ejemplo son soluciones acuosas estériles que no contienen materiales además de los ingredientes activos y el agua, o contienen un amortiguador tal como fosfato de sodio a un valor de pH fisiológico, solución salina fisiológica o ambos, tal como solución salina amortiguada con fosfato. Aún más, los portadores acuosos pueden contener más de una sal amortiguadora, así como sales tales como cloruros de sodio y potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos. Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y con exclusión del agua. Los ejemplos de tales fases líquidas adicionales son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón y emulsiones de agua y aceite. La cantidad de un agente activo usado en los métodos descritos en la presente que será efectiva en el tratamiento de un trastorno o afección particular dependerá de la naturaleza del trastorno o afección, y puede determinarse mediante técnicas clínicas estándar. Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, un texto de referencia estándar en este campo de la técnica. Por ejemplo, una composición parenteral adecuada para administración por inyección se prepara disolviendo 1.5% en peso de ingrediente activo en solución de cloruro de sodio al 0.9%.

En una modalidad, el portador "farmacéuticamente aceptable" no incluye medios de cultivo celular *in vitro*.

En una modalidad, el término “farmacéuticamente aceptable” significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en humanos. Específicamente, se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que están, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.

El término “portador” se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluidos aquéllos de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soya, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores del pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida, y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Los ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a Ed., Gennaro, ed. (Mack Publishing Co., 1990). La formulación debe adaptarse al modo de administración.

Un “sujeto”, como se usa en la presente, incluye cualquier animal que muestre un síntoma de una enfermedad, trastorno o afección monogénica que pueda tratarse con los vectores de terapia génica, terapéutica basada en células, y los métodos dados a conocer en

otra parte de la presente. En modalidades preferidas, un sujeto incluye cualquier animal que muestre síntomas de una enfermedad, trastorno o afección que pueda tratarse con los vectores de terapia génica, terapéutica basada en células y los métodos contemplados en la presente. Los sujetos adecuados (por ejemplo, los pacientes) incluyen animales de laboratorio (tales como ratones, ratas, conejos o conejillos de indias), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tales como gatos o perros). Se incluyen primates no humanos y, preferiblemente, pacientes humanos. Los sujetos típicos incluyen animales que exhiben cantidades anómalas (cantidades menores o mayores que en un sujeto “normal” o “sano”) de una o más actividades fisiológicas que pueden ser moduladas por la terapia. Un sujeto se refiere a un mamífero, que incluye, entre otros, un mamífero humano o no humano, tal como un bovino, equino, canino, ovino o felino.

Los rangos proporcionados en la presente se entienden como una forma abreviada de todos los valores dentro del rango. Por ejemplo, se entiende que un rango de 1 a 50 incluye cualquier número, combinación de números, o sub-rango del grupo que consiste en 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50.

El término “tejido” se refiere a un grupo o capa de células igualmente especializadas que juntas realizan ciertas funciones especiales. El término “tejido específico” se refiere a una fuente o característica definitoria de células de un tejido específico.

Cuando se utilizan en la presente, los términos “tratar”, “que trata”, “tratamiento” y similares se refieren a reducir o mejorar un trastorno y/o síntoma asociado con el mismo. Se apreciará que, aunque no está excluido, el tratamiento de un trastorno o afección no requiere que el trastorno, afección o síntomas asociados con el mismo sean eliminados por completo.

A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, cuando se usa en la presente, el término “o” se entiende que es inclusivo. A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, cuando se usan en la presente, los términos “un”, “uno/una” y “el/la” se entiende que son singular o plural.

A menos que se indique específicamente o sea obvio por el contexto, cuando se usa en la presente, el término “aproximadamente” se entiende que está dentro de un rango de tolerancia normal en la técnica, por ejemplo, dentro de 2 desviaciones estándar de la media. Aproximadamente se puede entender que está dentro del 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%,

2%, 1%, 0.5%, 0.1%, 0.05% o 0.01% del valor establecido. A menos que el contexto aclare lo contrario, todos los valores numéricos proporcionados en la presente son modificados por el término aproximadamente.

La recitación de un listado de grupos químicos en cualquier definición de una variable en la presente incluye definiciones de esa variable como cualquier grupo único o combinación de grupos listados. La recitación de una modalidad para una variable o aspecto en la presente incluye esa modalidad como cualquier modalidad individual o en combinación con cualquier otra modalidad o partes de la misma.

Cualquier composición o método proporcionado en la presente puede combinarse con una o más de cualquiera de las otras composiciones y métodos proporcionados en la presente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las FIGS. 1A-1C muestran la caracterización de las oscilaciones de Ca^{2+} en islas iPSC-CM aisladas. La FIG. 1A muestra imágenes inmunofluorescentes de iPSC-CMs de WT, CPVTp y CPVTe, teñidas por el marcador sarcomérico ACTN2. Las líneas celulares tenían una apariencia indistinguible. Barra, 50 μm . La FIG. 1B muestra que las chispas de Ca^{2+} registradas a partir de iPSC-CMs cargados con Fluo-4 mediante imágenes obtenidas por escaneo de líneas focales. El diagrama de violín muestra la distribución de la frecuencia de chispas de Ca^{2+} . El número por cada forma denota el número de grupos de células. La FIG. 1C muestra las oscilaciones de Ca^{2+} registradas por las imágenes obtenidas por escaneo de líneas focales de las islas iPSC-CM aisladas. Las flechas y puntas de flecha indican eventos anómalos de liberación temprana y tardía de Ca^{2+} , respectivamente. El número por cada forma denota el número de grupos de células. Prueba no paramétrica de Steel Dwass con corrección de prueba múltiple; #, vs WT; †, vs WT+ISO; § vs CPVTp; ¥ vs CPVT. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Las FIGS. 2A-2F muestran el tejido cardíaco diseñado con opto-MTF para el modelado de arritmia. La FIG. 2A muestra el esquema del sistema opto-MTF para regular el ritmo de manera óptica y medir ópticamente la propagación y contracción de la onda de Ca^{2+} a nivel de tejido. Los cardiomiocitos programados para expresar ChR2 se siembran en gelatina micro-moldeada con voladizos flexibles en un extremo. La iluminación focal utiliza fibras ópticas que excitan las células, lo que resulta en la propagación de ondas de Ca^{2+} a lo largo del MTF y hacia los voladizos. La propagación de la onda de Ca^{2+} se mide mediante obtención de

imágenes fluorescentes con el colorante X-Rhod-1 sensible al Ca^{2+} , y la contracción mecánica mediante obtención de imágenes de campo oscuro de los voladizos. La FIG. 2B muestra imágenes confocales de opto-MTF teñidas con ACTN2. La gelatina micro-moldeada induce a los iPSC-CMs a crecer con su eje largo alineado con el eje largo del MTF. La FIG. 2C muestra el acoplamiento de excitación-contracción en opto-MTFs de CPVTp. Las imágenes representativas del lapso de tiempo muestran la propagación de ondas de Ca^{2+} y la sístole mecánica registrada inducida por la estimulación del punto optogenético. La FIG. 2D muestra los trazos de Ca^{2+} que se registraron en los puntos etiquetados con a-d en la imagen más la derecha de la FIG. 2C. Las líneas paralelas verticales a través de cada trazo indican el ritmo óptico en el punto de estimulación. El tiempo de activación es el momento hasta la velocidad máxima en subida de la señal de Ca^{2+} . La CaTD80 es la duración del transitorio de Ca^{2+} a un decaimiento del 80%. La FIG. 2E muestra los mapas espaciales del tiempo de activación, velocidad y dirección de la onda de Ca^{2+} , y CaTD80 para opto-MTFs de WT y CPVTp a un ritmo de 1.5 Hz, lo que demuestra un comportamiento bien ordenado de ambos tejidos. Barra, 1 mm. La FIG. 2F muestra la comparación de la frecuencia de post-despolarizaciones en islas de células de sacudida espontánea o tejido opto-MTF. Prueba exacta de Fisher: ***, $P < 0.001$.

Las FIGS. 3A-3I muestran la caracterización de las opto-MTFs de CPVT. La FIG. 3A muestra las imágenes del lapso de tiempo de la propagación del frente de onda y la contracción en voladizo de Ca^{2+} de la opto-MTF de CPVTp. Los frentes de onda de Ca^{2+} , calculados a partir de la derivada temporal de las señales de Ca^{2+} , muestran el re-ingreso de la onda espiral. Barra, 1 mm. La FIG. 3B muestra la señal de Ca^{2+} y los trazos de tensión contráctil durante el re-ingreso. El ejemplo representativo de la opto-MTF de CPVTp se reguló a un ritmo de 3 Hz. Las líneas paralelas verticales a través de cada trazo indican la regulación de ritmo óptica en el sitio de estimulación. La FIG. 3C muestra la aparición del re-ingreso en opto-MTFs de CPVT y WT. Regulación de ritmo alta, $\geq$ de 2 Hz; regulación de ritmo baja $<$ de 2 Hz. La alta frecuencia de regulación de ritmo y el ISO aumentaron la aparición del re-ingreso. Prueba al chi cuadrado de Pearson versus WT con las mismas condiciones: †, $P < 0.05$. ††, $P < 0.01$. †††, $P < 0.001$. Las barras están etiquetadas con números de muestra. Las FIGS. 3D-3F muestra los mapas espaciales del tiempo de activación de la onda de Ca^{2+} , velocidad y el CaTD80 en las opto-MTFs de WT o CPVTp. El mismo tejido se muestra con regulación de ritmo de 1.5 Hz o 3 Hz. La regulación de ritmo de 3 Hz aumentó la

heterogeneidad espacio-temporal. Las FIGS. 3G-3H muestra la velocidad global normalizada y CaTD80 (FIG. 3G) y su dispersión espacial y temporal (FIG. 3H) en función de la frecuencia de regulación de ritmo, bajo estimulación con ISO. Se incluyeron datos de tejidos con acoplamiento 1:1 (n = 12 WT, 12 CPVTp, 13 CPVTe de > 3 cosechas). Las líneas
 5 uniformes son funciones cuadráticas que se ajustan a los datos. Las áreas sombreadas representan el intervalo de confianza del 95% para el ajuste. En la FIG. 3G, los datos se normalizaron a valores de la misma opto-MTF a una regulación de ritmo de 1.5 Hz sin ISO. La FIG. 3I muestra que la gráfica de volcán muestra 54 parámetros a nivel de tejido de la propagación de Ca^{2+} en opto-MTFs de WT versus CPVT. Cada uno de los nueve marcadores
 10 representa la propiedad indicada medida a tres diferentes frecuencias de regulación de ritmo (1, 2 y 3 Hz) con y sin ISO. Las regiones sombreadas indican parámetros con $P < 0.05$ y un cambio de más de 2 veces. Barra en A, D-F = 1 mm.

Las FIGS. 4A-4D muestran el inicio del re-ingreso en opto-MTFs de CPVT. La FIG. 4A muestra la opto-MTF de CPVTp a una regulación de ritmo de 2 Hz con ISO. El mapa de
 15 activación y los campos de velocidad estaban bien ordenados. El histograma de velocidad refleja un rango estrecho de valores. La FIG. 4B muestra los trazados de Ca^{2+} desde los puntos a y b en el panel de la FIG. 4A. La FIG. 4C muestra la mismo opto-MTF que en la FIG. 4A, regulada a un ritmo de 3 Hz con ISO. Existe una mayor heterogeneidad en el campo de velocidad y desorganización del mapa de activación. El bloqueo de conducción localizado y la
 20 conducción retrógrada se hacen evidentes en el pulso #18 y #19. Los histogramas indican una mayor dispersión espacial de la velocidad. La FIG. 4D muestra los trazados de Ca^{2+} en los puntos a y b en el panel de la FIG. 4C. El bloqueo de la conducción y el comienzo del reingreso estuvieron asociados con una anomalía transitoria de Ca^{2+} .

Las FIGS. 5A-5F muestran que se requiere la fosforilación con CaMKII del RYR2-S2814 para expresar el fenotipo arrítmico de CPVT en grupos de células aisladas. La FIG. 5A
 25 muestra que los iPSC-CMs en grupos de células aisladas se trataron con ISO e inhibidores selectivos de CaMKII (C) o PKA (P). Las chispas de Ca^{2+} fueron procesadas gráficamente por barrido de línea confocal. La FIG. 5B muestra el esquema de RYR2 (se muestran dos subunidades de tetramero). Se resaltan tres residuos clave: S2808, el objetivo de la fosforilación con PKA; S2814, el objetivo de la fosforilación con CaMKII; y R4651, mutado
 30 en CPVTp. Las FIGS. 5C-5D muestran que la frecuencia de chispas de Ca^{2+} en CPVTe se

redujo por S2814A pero no por la mutación S2808A. La FIG. 5C muestra trazos representativos. La FIG. 5D muestra la distribución de la frecuencia de chispas de Ca^{2+} . Las FIGS. 5E-5F muestran una frecuencia transitoria anormal de Ca^{2+} . Las flechas y las puntas de flecha indican eventos de liberación anormales tempranos y tardíos de Ca^{2+} en trazados representativos (FIG. 5E). La distribución de la fracción de transitorios anormales de Ca^{2+} por célula (FIG. 5F). Prueba no paramétrica de Steel-Dwass con corrección de prueba múltiple; †, versus WT con tratamiento ISO de igualación; §, versus CPVTe con tratamiento ISO de igualación. † o §, $P < 0.05$; †† o §§, $P < 0.01$; ††† o §§§, $P < 0.001$.

Las FIGS. 6E-6H muestran que la mutación RYR2-S2814A previene el reingreso en tejidos diseñados por CPVT. La FIG. 6A son imágenes confocales de una opto-MTF construida utilizando iPSC-CMs de CPVTe-S2814A. Los miocitos están alineados por sustrato de gelatina micro-moldeada. La FIG. 6B muestra la opto-MTF de CPVTe-S2814A representativa. Los transitorios de Ca^{2+} y la contracción sistólica se acoplaron 1:1 con estímulos ópticos de 3 Hz (líneas azules). La FIG. 6C muestra la aparición del reingreso en opto-MTFs de CPVTe-S2814A en comparación con WT (†) y CPVTe (§) bajo las condiciones de igualación. Prueba al chi cuadrado de Pearson: † o §, $P < 0.05$. †† o §§, $P < 0.01$. ††† o §§§, $P < 0.001$. Las barras están etiquetadas con tamaños de muestra. La FIG. 6D muestra los mapas espaciales de la misma opto-MTF de CPVTe-S2814A regulada a un ritmo de 1.5 Hz o 3.0 Hz, en presencia de ISO. El tiempo de activación, la velocidad de propagación de onda de Ca^{2+} y CaTD80 estaban bien organizados y eran relativamente homogéneos en comparación con CPVTe (ver FIG. 3). La FIG. 6E-6F muestran la velocidad global y CaTD80 (FIG. 6E) o su dispersión espacial o temporal (FIG. 6F) como una función de la frecuencia de regulación de ritmo en CPVTe-S2814A en comparación con CPVT y WT. Las muestras fueron tratadas con ISO. Las muestras fueron tratadas con ISO. Solo se incluyeron tejidos que respondían 1:1 a cada estímulo ($n=12$ WT, 12 CPVTp, 13 CPVTe y 18 CPVTe-S2814A de > 3 cosechas). Las líneas uniformes son funciones cuadráticas que se ajustan a los datos; las áreas sombreadas muestran el intervalo de confianza del 95% para el ajuste. La velocidad global y CaTD80 se normalizaron a los datos del mismo tejido adquirido a 1.5 Hz sin ISO. La FIG 6G muestra un diagrama de volcán de 54 parámetros a nivel de tejido de la propagación de ondas de Ca^{2+} (por favor ver la FIG. 3). A diferencia de los parámetros de tejido de CPVT, los parámetros de tejido de CPVTe-S2814A no fueron estadísticamente diferentes de los de WT. La FIG. 6H

proporciona un diagrama esquemático que ilustra una estrategia experimental para generar vectores de virus adeno-asociados (AAV) que codifican una Autocamtida del Péptido Inhibidor de CaMKII (AIP). Se inyectó AAV9 en ratones por vía intraperitoneal en un estudio de electrofisiología (EP).

5 La FIG. 7 proporciona una serie de paneles que muestran la expresión de AAV9-GFP-AIP en el corazón (hilera superior) y en micrografías de tejido cardíaco.

La FIG. 8 proporciona dos gráficos que muestran el porcentaje de cardiomiocitos infectados por los virus AAV9. El gráfico de la izquierda muestra células con bajo GFP y células con señales de GFP medio. La columna a la izquierda de cada par de columnas es GFP bajo y la columna a la derecha es GFP medio. El gráfico de la derecha muestra células con diferente AIP en las mismas, las columnas en cada conjunto de 3 columnas de izquierda a derecha son AIP medio, alto y completo. El primer conjunto de columnas en cada panel incluye estos identificadores.

10

La FIG. 9 proporciona imágenes de transferencias Western que muestran niveles de CaMKII fosforilada (P) versus CaMKII (total) en lisados de corazón completo de ratones p10 inyectados con un vector que expresa AIP, AAV9-GFP-AIP, o con un vector de control.

15

La FIG. 10 proporciona un diagrama de caja que muestra la cuantificación de la fosforilación con CaMKII en células que expresan AAV9-GFP-AIP o un vector de control.

La FIG. 11 proporciona un diagrama esquemático que representa una genosustitución de R176Q en el canal de rianodina cardíaca (RYR2) como un modelo de CPVT.

20

La FIG. 12 es un diagrama esquemático que muestra la colocación de un catéter de regulación de ritmo y registro en los ratones. El método se describe completamente en Mathur, N. *et al.* Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology (2009).

La FIG. 13 es un diagrama esquemático que ilustra el protocolo utilizado para inducir y registrar arritmias CVPT murinas.

25

La FIG. 14 muestra electrocardiogramas basales en cepas naturales y ratones que tienen una mutación R176Q en el canal de rianodina cardíaca (RYR2).

La FIG. 15 es un gráfico que muestra los cambios en la frecuencia cardíaca en la cepa natural (WT) y los ratones que tienen una genosustitución de R176Q en el canal de rianodina cardíaca (RYR2) donde los ratones están expresando un adenovirus que codifica la Autocamtida del Péptido Inhibidor de CaMKII (AIP) o un control GFP. Las columnas en cada

30

conjunto de 3 columnas de izquierda a derecha son la línea base, isoproterenol y epinefrina. El primer conjunto de columnas incluye estos identificadores.

La FIG. 16 es un gráfico que cuantifica los cambios en el intervalo QT. Las columnas en cada conjunto de 3 columnas de izquierda a derecha son la línea base, el isoproterenol y la epinefrina. El primer conjunto de columnas incluye estos identificadores.

Las FIGS. 17A-17D son electrocardiogramas que muestran arritmia basal y espontánea en ratones que tienen una mutación R176Q en el canal de rianodina cardíaca (RYSR2), (ratones mutantes R176Q) inyectados con vectores de control que expresan GFP o inyectados con vectores que expresan AIP.

Las FIGS. 18A-18F muestran que la expresión *in vivo* de AIP reduce la probabilidad de arritmia inducida con regulación de ritmo (FIGS. 18A-18B) y catecolaminas (FIGS. 18C-18D). La FIG. 18E muestra el nivel de transducción relativo con dosis crecientes del virus AAV9. La FIG 18F muestra la supresión de arritmias ventriculares inducidas con diversas dosis de AIP. ** P<0.001, §P=0.7. *P<0.01, †P=0.4. N como se indica. Valores P por Valores P al chi cuadrado por chi cuadrado.

Las FIGS. 19A-19C Paciente con CPVT con la mutación RYSR2-R4651I. La FIG. 19A muestra los datos de la electrocardiografía de un sistema de monitorización cardíaca insertable, obtenido para este paciente. El paciente desarrolló taquicardia ventricular bidireccional (superior izquierda), que se convirtió en taquicardia ventricular polimórfica (superior derecha e inferior izquierda). El paciente se recuperó espontáneamente a un ritmo sinusal (abajo a la derecha). La FIG. 19B muestra los datos de secuenciación de Sanger en el locus RYSR2-R4651 para un iPSC individual normal y para un iPSC derivado del paciente. La flecha apunta a una mutación puntual que causa la sustitución de R4651I. La FIG. 19C es un dibujo esquemático de la proteína RYSR2 que muestra las regiones de puntos críticos de mutación (Regiones 1-4) y la ubicación de la mutación R4651I dentro de la región 4.

Las FIGS. 20A-20G demuestran la caracterización y edición del genoma de las líneas de iPSC de CPVT. Las FIGS. 20A-20D muestran análisis de control de calidad de la línea de iPSC de CPVTp. Las células de CPVTp tenían cariotipo normal (FIG. 20A), expresión de marcadores de pluripotencia (FIG. 20B), morfología típica de colonias (FIG. 20C), y formaron teratomas que producían derivados de tres capas germinales, cuando es evaluado mediante la tinción H&E de secciones histológicas (FIG. 20D). La FIG. 20E es un esquema del protocolo

utilizado para diferenciar los iPSC-CMs de iPSCs. La FIG. 20F es un diagrama FACS que muestra la pureza de los iPSC-CMs seleccionados con lactato. La FIG. 20G son los resultados de secuenciación de Sanger que muestran una edición efectiva del genoma para introducir la mutación heterocigótica R4651I en las iPSC de tipo natural PGP1, que crea la línea celular llamada CPVTe.

La FIG. 21 es la plataforma de grabación de Opto-MTF diseñada. Las fibras ópticas estimulan áreas focales en la opto-MTF. La opto-MTF se ilumina bajo un microscopio para obtener imágenes simultáneas en campo oscuro de voladizos mecánicos utilizando una cámara de alta resolución espacial, y para obtener imágenes fluorescentes de propagación de ondas de Ca^{2+} utilizando una cámara de alta sensibilidad y alta velocidad.

Las FIGS. 22A-22L muestran la fabricación de opto-MTFs sembradas con hiPSC-CMs.

La FIG. 23 muestra la imagen confocal de la opto-MTF de CPVTe. La opto-MTF de CPVTe fue inmunoteñida en el marcador ACTN2 de disco Z sarcomérico y marcador DAPI nuclear. Las iPSC-CMs se alinearon en paralelo. Barra = 20 μm .

Las FIGS. 24A-24B muestran el mapeo óptico de la propagación de ondas de Ca^{2+} en una opto-MTF. La FIG. 24A son imágenes de lapso de tiempo de la opto-MTF que muestran la señal X-Rhod-1 (“obtención de imágenes de Ca^{2+} ”) y la obtención de imágenes de campo oscuro de voladizos deformables en el extremo del MTF. La FIG. 24B son trazos de los transitorios de Ca^{2+} y el estrés mecánico en las MTFs. La señal X-Rhod-1 de Ca^{2+} se registró en los puntos a-d, etiquetada en la imagen de más a la derecha de (FIG. 24A). Las líneas paralelas verticales a través de los trazos indican señales de regulación de ritmo óptica de 488 nm.

Las FIGS. 25A-25B muestran la independencia de MTFs adyacentes en el constructo de opto-MTF. La FIG. 25A muestra la contracción sistólica y diastólica máxima de las MTFs tras estimulación óptica independiente en MTF con diferentes frecuencias de regulación de ritmo (1.5, 2, 3 y 4 Hz). La FIG. 25B muestra trazos del estrés de cada MTF. Cada MTF es estimulada por una fibra óptica separada a una frecuencia diferente. La sístole mecánica de cada MTF era independiente de las otras MTFs, como se demuestra aquí por medio de las diferentes frecuencias de los trazos de tensión. Las líneas azules indican la regulación de ritmo óptica.

Las FIGS. 26A-26D muestran la dispersión espacial y temporal de la velocidad y la duración transitoria del calcio en las opto-MTFs. Se calculó la heterogeneidad de la velocidad de propagación o la duración transitoria del calcio al 80% de recuperación (CaTD80) de las opto-MTFs construidas usando las células indicadas: NRVM, cardiomiocitos ventriculares de ratas neonatales; Cor.4U, iPSC-CMs de Axiogenesis; WT, CPVTe y CPVTe-S2814A, iPSC-CMs de este estudio. Prueba estadística Name: *, $P < 0.05$. **, $P < 0.01$. ***, $P < 0.001$.

Las FIGS. 27A-27D muestran las ondas espontáneas de Ca^{2+} en opto-MTFs. Las opto-MTFs construidas a partir de iPSC-CMs de CPVTp (FIG. 27A), CPVTe (FIG. 27B) o WT (FIG. 27C), se permitieron latir espontáneamente. Las ondas de Ca^{2+} se registraron ópticamente por la intensidad de fluorescencia de X-Rhod-1. En las FIGS. 27A-27C, los paneles izquierdos son mapas de activación, y los trazos derechos son señales de Ca^{2+} en los puntos indicados en la MTF. Se observa la falta de transitorios anómalos de Ca^{2+} . Las ondas espontáneas de Ca^{2+} se originaron en los bordes de las MTFs. La FIG. 27D muestra la señal de Ca^{2+} en píxeles individuales de las anomalías transitorias de Ca^{2+} analizadas en los tejidos indicados, consistentes con EADs o DADs. No se observó en ninguno de las opto-MTFs que latían espontáneamente. La frecuencia de latido espontáneo de las opto-MTFs fue comparable entre los tipos de iPSC-CM. Todas representan la unión de todos los tejidos de CPVTp y CPVTe registrados.

La FIG. 28 demuestra la aparición del reingreso en opto-MTFs de WT, CPVTp y CPVTe. La aparición del reingreso en opto-MTFs ensambladas a partir de opto-MTFs de WT, CPVTp y CPVTe, estimuladas con ISO o de baja regulación de ritmo (< 2 Hz) o alta regulación de ritmo (≥ 2 Hz). †, comparación con el grupo de tratamiento comparable para WT; § Comparación con el grupo de tratamiento comparable para CPVTp. Prueba de Fisher: † o §, $P < 0.05$; †† o §§, $P < 0.01$; ††† o §§§, $P < 0.001$.

Las FIGS. 29A-29D muestran el reingreso en la opto-MTF de CPVTe. FIGS. 29A-29B. Regulación de ritmo a 2 Hz. Las ondas de Ca^{2+} están bien ordenadas. Los trazos de Ca^{2+} desde los puntos etiquetados en el panel izquierdo de A se muestran en B. FIGS. 29C-29D. Regulación de ritmo del mismo tejido a 3 Hz. Las ondas de Ca^{2+} son caóticas y se forman múltiples áreas de reingreso. Los trazos de Ca^{2+} de los puntos etiquetados en los paneles izquierdos de la FIG. 29C, se muestran en la FIG. 29D. Se observa que el punto d más distal tiene un acoplamiento 3:2 o 2:1 con el estímulo por regulación de ritmo. Los mapas de

activación y los trazos de Ca^{2+} se calcularon procesando datos de imágenes de Ca^{2+} en las películas obtenidas.

Las FIGS. 30A-30B muestran la vulnerabilidad de las opto-MTF de WT, CPVTp y CPVTe al reingreso. La FIG. 30A muestra la velocidad de propagación de la onda de Ca^{2+} y CaTD80 de los tejidos tratados con ISO a las frecuencias de regulación de ritmo indicadas. La FIG. 30B muestra la dispersión espacial y temporal de la velocidad de propagación de la onda de Ca^{2+} y CaTD80 en tejidos tratados con ISO a las frecuencias de regulación de ritmo indicadas.

La FIG. 31 muestra el análisis estadístico de las propiedades de la opto-MTF. Se analizaron nueve parámetros con y sin tratamiento ISO a frecuencias de regulación de ritmo de 1, 2 y 3 Hz. Estas 54 comparaciones se hicieron entre WT y CPVT (unión de CPVTp y CPVTe) y entre WT y CPVTe-S2814A.

Las FIGS. 32A-32D muestran el inicio del reingreso en la opto-MTF de CPVTe. Las FIGS. 32A-32B muestran las ondas organizadas de Ca^{2+} a un ritmo de regulación de 2 Hz. Los trazos en la FIG. 32B se registraron desde los puntos etiquetados en la FIG. 32A. FIGS. 32C-32D. Desarrollo del reingreso a una regulación de ritmo de 2.5 Hz. Los trazos en la FIG. 32D se registraron a partir de los puntos etiquetados en la FIG. 32C. Se observa el desarrollo de la anomalía transitoria de Ca^{2+} después del pulso 2, acompañado por el inicio del reingreso en el pulso 3.

La FIG. 33 muestra la inhibición de la actividad de CaMKII por el péptido inhibidor permeable a las células. Los iPSCCMs se trataron con el inhibidor del péptido CaMKII AIP permeable a las células (250 nM). Las células se estimularon durante 60 minutos con ISO 1 μM antes de analizar los extractos celulares mediante inmunotransferencia. En las células de tipo natural (PGP1), la fosforilación de CaMKII T286 fue bloqueada por AIP, mientras que el CaMKII total permaneció sin cambio. En las células CPVTp, hubo activación basal de CaMKII. Esta fue bloqueada por AIP.

Las FIGS. 34A-34D muestran la edición del genoma de los sitios S2808 y S2814 de RYR2. La FIG. 34A es un esquema de la estrategia de edición del genoma utilizada para obtener las mutaciones homocigotas S2808A o S2814A en ya sea iPSCs de PGP1 (WT) o PGP1-RYR2R4651I/+ (CPVTe). La FIG. 34B muestra una secuenciación representativa de Sanger para confirmar la edición del genoma. La FIG. 34C muestra la diferenciación de iPSC-

CM de las líneas celulares editadas del genoma. La FIG. 34D muestra que las líneas celulares mutantes S2814A no exhibieron fosforilación de S2814 en la estimulación con ISO.

La FIG. 35A muestra que los pacientes con CPVT tenían electrocardiogramas de reposo normales pero arritmias graves, potencialmente mortales, con ejercicio. VT, taquicardia ventricular. VF, fibrilación ventricular. Los trazos son bocetos idealizados que se muestran con fines ilustrativos.

La FIG. 35B muestra la fisiopatología de CPVT. Izquierda, dibujo de la liberación de Ca^{2+} inducida por el Ca^{2+} del cardiomiocito 1. El potencial de acción abre el canal Ca^{2+} tipo L (LTCC); 2. El Ca^{2+} induce la apertura de RYR2 y la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico (SR); 3. El Ca^{2+} intracelular elevado induce una contracción del miofilamento; 4. El Ca^{2+} se limpió del citosol por medio de SERCA y NCX. Derecha, las mutaciones de CPV en RYR2 aumentan la fuga diastólica del Ca^{2+} .

La FIG. 36 muestra un esquema para el tratamiento de animales adolescentes con AAV9 y flujo de trabajo para el análisis de células individuales y con regulación de ritmo ventricular.

Las FIGS. 37A-37B muestran los efectos de AAV9-GFP-AIP en cardiomiocitos aislados individuales de animales tratados. La FIG. 37A muestra trazados de líneas confocales del indicador de Ca^{2+} (Rhod-2) después de una regulación de ritmo externa durante 1 minuto. El Ca^{2+} espontáneo se registra y cuantifica (FIG. 37B). N=33 (GFP), N=25 (AIP). **P<0.01.

Las FIGS. 38A-38C muestran la supresión de arritmias ventriculares inducidas en ratones mutantes R176Q tratados con ya sea GFP o AIP por AAV9 mediante inyección retro-orbital. La FIG. 38A muestra un trazado representativo de arritmia ventricular inducida (panel superior) o sin arritmia (panel inferior) en animales tratados ya sea con GFP o AIP respectivamente. Las FIGS. 38B-38C muestran el porcentaje de animales con arritmias ventriculares (FIG. 38B) o la duración de las arritmias ventriculares inducidas por la regulación de ritmo (FIG. 38C). N=6 (GFP), N=6 (AIP), *P<0.01.

Las FIGS. 39A-39B muestran la supresión de la señalización anormal de Ca^{2+} con ARNs modificados en los inhibidores peptídicos. Se transfectaron cardiomiocitos adultos de ratones RYR2-R176Q con ARN modificado (ARNsmod) para inhibidores peptídicos AIP y CN19o o se fusionaron con la proteína vinculante de RYR2 FKBP12.6 y co-expresaron mCherry. Después de cultivar durante 12 horas, los cardiomiocitos individuales se cargaron

con un indicador de Ca^{2+} (Fluo-4) y se reguló el ritmo durante 1 minuto antes de registrar los eventos de Ca^{2+} posteriores a la regulación del ritmo. La FIG. 39A muestra trazados de líneas confocales representativos de cardiomiocitos adultos y la expresión de mCherry (izquierda). La FIG. 39B muestra la cuantificación de todos los inhibidores probados en comparación con mCherry solamente. La reducción estadísticamente significativa en eventos anormales de Ca^{2+} posteriores a la regulación de ritmo en cardiomiocitos, expresa CN19o y es casi significativa en células que expresan AIP en comparación con mCherry solamente. N=15 (mCherry), N=5 (AIP), N=5 (FKBP12.6-AIP), N=5 (CN19o), N=7 (FKBP12.6-CN19o). Valor P para AIP=0.07, *P<0.05, §P>0.5.

La FIG. 40 muestra la expresión relativa de nuevas cápsides de AAV a través de múltiples tejidos. Después de la inyección de 2×10^{10} vg/g de cada virus AAV mediante inyección subcutánea en el día 3 postnatal, los tejidos se cosecharon el día 28 postnatal y se procesaron para obtener ARN total. La FIG. 40 muestra niveles relativos de ARNm de GFP normalizados a la expresión de proteína vinculante a tata (TBP). El Anc82 auto-complementario (SC) demuestra una mayor expresión en el músculo y corazón en comparación con AAV9.

La FIG. 41 muestra la inhibición de AIP de transitorios de calcio anómalos en dos iPSC-CMs adicionales derivados del paciente que contienen mutaciones RYR2 en las regiones 1 y 3 de puntos críticos (R1 y R3). Los genotipos CPVT-R1 y CPVT-R3 fueron S404R y G3946S respectivamente. El AIP fue efectivo en la reducción de transitorios anormales de calcio en estos dos genotipos de CPVT adicionales. Número de células individuales que se indicó, P<0.01 al Chi Cuadrado.

La FIG. 42 muestra la inhibición de AIP de chispas de calcio anómalas en las CM-iPSC diseñadas con Cas9 (CPVTe2) que de otro modo son isogénicas para la línea WT. La mutación diseñada es RYR2-D385N, que se encuentra en pacientes con CPVT. El AIP redujo la frecuencia de chispas de calcio de vuelta a índices comparables a las observadas en WT.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) es una arritmia hereditaria causada predominantemente por una mutación autosómica dominante del gen que codifica el receptor cardíaco de rianodina (RYR2), el principal canal intracelular de liberación de calcio de los cardiomiocitos. Típicamente, los pacientes con CPVT son asintomáticos en

reposo, pero desarrollan taquicardia ventricular potencialmente letal durante el ejercicio o la angustia emocional (FIG. 35A). En los cardiomiocitos de cepa natural, cuando el potencial de acción cardíaca abre el canal de Ca^{2+} de tipo L sensible al voltaje, ubicado en la membrana plasmática, el influjo local resultante de Ca^{2+} desencadena la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico a través de RYR2 (FIG. 35B). El aumento resultante en el Ca^{2+} citoplasmático conduce a la contracción del sarcómero. A medida que la célula ingresa en la diástole, la RYR2 se cierra y se bombea nuevamente Ca^{2+} citosólico al retículo sarcoplásmico. En las células portadoras de mutaciones asociadas con CPVT, la RYR2 se libera más en el citoplasma, lo que da como resultado un Ca^{2+} diastólico elevado que dirige el intercambio de sodio y calcio a través de la membrana plasmática por medio del intercambiador de calcio y sodio (NCX1), lo que lleva a despolarizaciones posteriores que pueden desencadenar potenciales de acción adicionales. Se desconoce el mecanismo molecular mediante el cual la estimulación de catecolaminas desenmascara la naturaleza arrítmica de las mutaciones de CPVT. Los mecanismos mediante los cuales la mutación RYR2 produce el fenotipo clínico de taquicardia ventricular también son inciertos.

Los inventores descubrieron que la inhibición de la activación de CaMKII y la posterior señalización descendente reducen significativamente la arritmia latente estimulada por catecolaminas que está asociada con mutaciones en el canal de rianodina de calcio, RYR2. En experimentos *in vivo*, los inventores mostraron que el inhibidor de péptidos, AIP, cuando se expresa *in vivo* en tejidos cardíacos de ratones modelo de CPVT, inhibía la arritmia en los ratones modelo de CPVT. Ver el Ejemplo 2, FIGS. 17 y 18. Los inventores también encontraron que la fosforilación mediada por CaMKII del residuo de serina en S2814 en RYR2 es esencial para la arritmia latente estimulada por catecolaminas en mutaciones de CPVT. La mutación de la serina en alanina revierte la frecuencia anómala de chispas de Ca^{2+} registrada en células cardíacas que tienen mutaciones asociadas con CPVT en la proteína RYR2.

De acuerdo con esto, la invención presenta composiciones que presentan inhibidores de la CAMKII, tal como un péptido AIP, análogo o fragmento del mismo, polinucleótidos que codifican tales péptidos, composiciones terapéuticas que comprenden péptidos y polinucleótidos AIP, y métodos para usar tales composiciones para el tratamiento de sujetos que tienen una mutación en un canal cardíaco de rianodina (RYR2) que predispone a los

misimos a la CPVT. Estos inhibidores de péptidos pueden administrarse usando vectores virales adeno-asociados (AAV), u otros vectores que incluyan adenovirus y lentivirus. Las composiciones y métodos también pueden usarse para el tratamiento de otras formas de enfermedad cardíaca.

5 Mientras que los cardiomiocitos derivados de iPSC de CPVT aislados (iPSC-CM) eran propensos a transitorios anómalos de calcio, estos eran poco comunes en tejidos de CPVT no estimulados. Sin embargo, los tejidos de CPVT estimulados por catecolaminas y rápida regulación de ritmo fueron vulnerables al reingreso potencial de acción, recapitulando la característica de dependencia del ejercicio de la enfermedad clínica. Utilizando la edición del
10 genoma Cas9, se identificó un único evento de fosforilación dirigido por catecolaminas, la fosforilación de RYR2-S2814 por la proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} -calmodulina II (CaMKII), como necesaria para desenmascarar la pro-arritmia en láminas de miocardio de CPVT modificadas. Estos estudios iluminan la patogénesis molecular y celular de la CPVT, revelando un papel crítico del reingreso dependiente de CaMKII en el mecanismo a escala
15 tisular de esta enfermedad. Es importante destacar que la invención proporciona un modelo de arritmia *in vitro* que comprende iPSC-CMs en un modelo de tejido de miocardio optogenético modificado.

En un aspecto, se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un vector que codifica un inhibidor del péptido de
20 CaMKII y un portador farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un vector que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII y un portador farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de la arritmia cardíaca, por ejemplo, tal como la CPVT.

25 En un aspecto, se proporciona en la presente una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un vector que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII y un portador farmacéuticamente aceptable para usarse en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de arritmia cardíaca, por ejemplo, tal como la CPVT.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un vector de expresión que comprende
30 un polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII.

En un aspecto, se proporciona en la presente un vector de expresión que comprende

un polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII para usarse en el tratamiento de arritmia cardíaca, por ejemplo, tal como la CPVT.

En un aspecto, se proporciona en la presente un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII para usarse en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de arritmia cardíaca, por ejemplo, tal como la CPVT.

En otro aspecto, se proporciona en la presente una célula que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII.

En un aspecto, se proporciona en la presente una célula que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII para usarse en el tratamiento de arritmia cardíaca, por ejemplo, tal como la CPVT.

En un aspecto, se proporciona en la presente una célula que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII para usarse en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de arritmia cardíaca, por ejemplo, tal como la CPVT.

La composición farmacéutica descrita, el vector de expresión y las células que comprenden un vector de expresión son todos útiles para el tratamiento de la arritmia cardíaca en un sujeto.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para modular una arritmia cardíaca en un sujeto, el método comprende poner en contacto una célula que comprende un canal de rianodina cardíaca (RYR2) con un inhibidor de CaMKII, un inhibidor del péptido de CaMKII o un polinucleótido que codifica el inhibidor del péptido de CaMKII.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para inhibir la fosforilación de un polipéptido del canal de rianodina (RYR2) en un sujeto, el método comprende poner en contacto una célula que comprende un canal de rianodina cardíaca (RYR2) con un inhibidor de CaMKII, un inhibidor del péptido de CaMKII o un polinucleótidos que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para tratar a un sujeto que comprende una mutación asociada con una arritmia cardíaca, el método comprende administrar al sujeto un inhibidor de CaMKII, un inhibidor del péptido de CaMKII, análogo o fragmento del mismo o un polinucleótido que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para tratar a un sujeto que tiene una arritmia cardíaca, el método comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un vector que codifica un inhibidor del péptido de CaMKII y un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, la arritmia cardíaca es CPVT. En una modalidad, la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa o por inyección intracardiaca.

En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para caracterizar un cardiomiocito, el método comprende monitorear la conducción o contracción cardíaca usando un cardiomiocito derivado de células madre pluripotentes inducidas (iPSC-CM) que expresa un canal de rianodina cardíaca (RYR2) que comprende una mutación asociada con CPVT.

En otro aspecto, en la presente se proporciona un método de detección selectiva de compuestos, el método comprende poner en contacto un cardiomiocito derivado de células madre pluripotentes inducidas que expresa un canal de rianodina cardíaca (RYR2) que comprende una mutación asociada con CPVT con un agente candidato y medir la conducción o contracción cardíaca en la célula. En otras modalidades, el método comprende medir la frecuencia de chispas de Ca^{2+} y re-entrada de Ca^{2+} y otros parámetros descritos en la sección de Ejemplos.

En una modalidad de cualquier aspecto descrito, el inhibidor del péptido de CaMKII es AIP, CN19, CN19o, CN27, CN21, o un análogo o fragmento del mismo.

En una modalidad de cualquiera aspecto descrito o de cualquier modalidad anterior descrita, el inhibidor del péptido de CaMKII está operativamente unido a un promotor adecuado para dirigir la expresión del péptido en una célula cardíaca de mamífero. Los promotores para la expresión de células específica del musculo cardíaco son conocidos en la técnica, por ejemplo, el promotor de troponina T cardíaca, el promotor de la cadena pesada de α -miosina (α -MHC), el promotor de la cadena ligera 2v de miosina (MLC-2v) o el promotor de NCX1 cardíaco.

En una modalidad de cualquier aspecto del método descrito, la célula en contacto es un cardiomiocito.

En una modalidad de cualquier aspecto del método descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el cardiomiocito en contacto tiene una mutación en un canal de rianodina cardíaca (RYR2) en el mismo.

En una modalidad de cualquier aspecto del método descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el cardiomiocito en contacto tiene más de una mutación en un canal de RYR2 en el mismo.

5 En una modalidad de cualquier aspecto descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el vector se usa en una composición farmacéutica que comprende una cantidad efectiva de un inhibidor del péptido de CaMKII, análogo o fragmento del mismo.

En una modalidad de cualquier aspecto descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el vector es un vector viral retroviral, adenoviral o adeno-asociado.

10 En una modalidad de cualquier aspecto descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, la arritmia cardíaca es una taquicardia ventricular.

En una modalidad de cualquier aspecto descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, la taquicardia ventricular es inducida por el ejercicio o por el estrés.

En una modalidad de cualquier aspecto descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, la taquicardia ventricular es la CPVT.

15 En una modalidad de cualquier aspecto descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, la arritmia cardíaca implica o está asociada con una mutación genética.

En una modalidad de cualquier aspecto descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, la mutación genética asociada con la arritmia cardíaca se encuentra en un canal RYR2 en los cardiomiocitos.

20 En una modalidad de cualquier aspecto descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, la mutación genética en RYR2 ocurre en la región 1 (residuos de aminoácidos 77-466), región 2 (residuos de aminoácidos 2246-2534), región 3 (residuos de aminoácidos 3778-4201) o región 4 (residuos de aminoácidos 4497-4959) del polipéptido RYR2.

25 En una modalidad de cualquier aspecto descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, la mutación genética en RYR2 es una sustitución del aminoácido arginina por isoleucina en la posición de aminoácido 4651 en la región 4 del polipéptido RYR2 (R4651I) (RYR2^{R4651I}).

30 En una modalidad de cualquier aspecto descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, la mutación genética en RYR2 es una sustitución del aminoácido arginina por glutamina en la posición de aminoácido 176 en la región 1 del polipéptido RYR2 (R176Q) (RYR2^{R176Q}).

En una modalidad de cualquier aspecto descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, la mutación genética en RYR2 es una sustitución del aminoácido ácido aspártico por asparagina en la posición de aminoácidos 385 del polipéptido RYR2 (D385N) (RYR2^{D385N}).

5 En una modalidad de cualquier aspecto descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, la mutación genética en RYR2 es una sustitución del aminoácido serina por arginina en la posición de aminoácido 404 del polipéptido RYR2 (S404R) (RYR2^{S404R}).

En una modalidad de cualquier aspecto descrito, la mutación genética en RYR2 es una sustitución del aminoácido glicina por serina en la posición de aminoácido 3946 del polipéptido RYR2 (G3946S) (RYR2^{G3946S}).

10 En una modalidad de cualquier aspecto del método descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el método inhibe una arritmia cardíaca en el sujeto.

En una modalidad de cualquier aspecto del método descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el método reduce las incidencias de arritmia cardíaca en el sujeto. Por ejemplo, la frecuencia de arritmia cardíaca durante un período de tiempo en el sujeto.

15 En una modalidad de cualquier aspecto del método descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el método reduce las incidencias de arritmia cardíaca en el sujeto durante la estimulación por ejercicio o estrés emocional.

En una modalidad de cualquier aspecto del método descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el método inhibe la taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) en el sujeto.

20 En una modalidad de cualquier aspecto del método descrito o cualquier otra modalidad anterior descrita, el método reduce la CPVT en el sujeto.

En una modalidad de cualquier aspecto del tratamiento o método de modulación descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el método comprende además seleccionar un sujeto que tiene una arritmia cardíaca o CPVT.

25 En una modalidad de cualquier aspecto del tratamiento o método de modulación descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el método comprende además seleccionar un sujeto que tenga una mutación asociada con una arritmia cardíaca o CPVT.

30 En una modalidad de cualquier aspecto del tratamiento o método de modulación descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el método comprende además seleccionar un sujeto que tenga una mutación asociada con una arritmia cardíaca, en donde la mutación se

encuentra en un canal de rianodina de calcio (RYR2) en los cardiomiocitos. En una modalidad, la mutación genética en RYR2 se presenta en la región 1 (residuos de aminoácidos 77-466), región 2 (residuos de aminoácidos 2246-2534), región 3 (residuos de aminoácidos 3778-4201) o región 4 (residuos de aminoácidos 4497-4959) del polipéptido RYR2. En otra

5 modalidad, la mutación genética se selecciona del grupo que consiste de RYR2^{R4651I}, RYR2^{R176Q}, RYR2^{D385N}, RYR2^{S404R} y RYR2^{G3946S}.

En una modalidad de cualquier aspecto del método de detección selectiva descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el iPSC-CM se deriva de un sujeto que tiene una mutación asociada con una arritmia cardíaca. En otra modalidad, el sujeto tiene más de una

10 mutación asociada con una arritmia cardíaca, tal como RYR2^{R4651I}, RYR2^{R176Q}, RYR2^{D385N}, RYR2^{S404R} y RYR2^{G3946S} en la proteína del canal RYR2.

En una modalidad de cualquier aspecto del método de detección selectiva descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una o más mutaciones en un canal de rianodina cardíaca (RYR2) en el mismo. Por ejemplo, tiene ambas mutaciones RYR2^{R4651I}

15 y RYR2^{R176Q}, ambas mutaciones RYR2^{D385N} y RYR2^{S404R}, o ambas mutaciones RYR2^{S404R} y RYR2^{G3946S}. En algunas modalidades, se incluyen todas las combinaciones posibles de mutaciones múltiples que se presentan en RYR2^{R4651I}, RYR2^{R176Q}, RYR2^{D385N}, RYR2^{S404R} y RYR2^{G3946S} en la proteína del canal RYR2.

En una modalidad de cualquier aspecto del método de detección selectiva descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una o más mutaciones en RYR2

20 que se produce en la región 1 (residuos de aminoácidos 77-466), región 2 (residuos de aminoácidos 2246-2534), región 3 (residuos de aminoácidos 3778-4201) o región 4 (residuos de aminoácidos 4497-4959) del polipéptido RYR2.

En una modalidad de cualquier aspecto del método de detección selectiva descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una mutación que da como

25 resultado una sustitución de aminoácido arginina por isoleucina en la posición de aminoácido 4651 en la región 4 del polipéptido RYR2 (R4651I) (RYR2^{R4651I}).

En una modalidad de cualquier aspecto del método de detección selectiva descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una mutación que da como

30 resultado una sustitución de aminoácido arginina por glutamina en la posición 176 de aminoácido en la región 1 del polipéptido RYR2 (R176Q) (RYR2^{R176Q}).

En una modalidad de cualquier aspecto del método de detección selectiva descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácido ácido aspártico por asparagina en la posición 385 de aminoácido del polipéptido RYR2 (D385N) (RYR2^{D385N}).

5 En una modalidad de cualquier aspecto del método de detección selectiva descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una mutación que da como resultado una sustitución del aminoácido serina por arginina en la posición 404 del aminoácido del polipéptido RYR2 (S404R) (RYR2^{S404R}).

10 En una modalidad de cualquier aspecto del método de detección selectiva descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una mutación que da como resultado una sustitución del aminoácido glicina por serina en la posición 3946 de aminoácido del polipéptido RYR2 (G3946S) (RYR2^{G3946S}).

15 En un aspecto, se proporciona en la presente un cardiomiocito derivado de células madre pluripotentes inducidas (iPSC-CM) que expresa un canal de rianodina cardíaca (RYR2) que comprende una mutación asociada con la CPVT. Por ejemplo, tal como RYR2^{R4651I}, RYR2^{R176Q}, RYR2^{D385N}, RYR2^{S404R} y RYR2^{G3946S}.

En un aspecto, se proporciona en la presente un cardiomiocito derivado de células madre pluripotentes inducidas (iPSC-CM) que expresa un canal de rianodina cardíaca (RYR2) que comprende una mutación en el mismo.

20 En otro aspecto, se proporciona en la presente una composición que comprende iPSC-CMs que expresan un canal de rianodina cardíaca (RYR2) que comprende una mutación en la misma.

25 En otro aspecto, se proporciona en la presente una composición que comprende iPSC-CMs que expresan un canal de rianodina cardíaca (RYR2) que comprende una mutación asociada con la CPVT. Por ejemplo, como RYR2^{R4651I}, RYR2^{R176Q}, RYR2^{D385N}, RYR2^{S404R} y RYR2^{G3946S}.

30 En una modalidad de cualquier aspecto del iPSC-CM descrito o composición que comprende el iPSC-CM descrito o cualquier otra modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una mutación en RYR2 que ocurre en la región 1 (residuos de aminoácidos 77-466), región 2 (residuos de aminoácidos 2246-2534), región 3 (residuos de aminoácidos 3778-4201) o región 4 (residuos de aminoácidos 4497-4959) del polipéptido RYR2.

En una modalidad de cualquier aspecto del iPSC-CM descrito o composición que comprende el iPSC-CM descrito o cualquier otra modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene más de una mutación en el canal RYR2.

5 En una modalidad de cualquier aspecto del iPSC-CM descrito o composición que comprende el iPSC-CM descrito o cualquier otra modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una mutación que da como resultado una sustitución del aminoácido arginina por isoleucina en la posición de aminoácido 4651 en la región 4 del polipéptido RYR2 (R4651I) (RYR2^{R4651I}).

10 En una modalidad de cualquier aspecto del iPSC-CM descrito o composición que comprende el iPSC-CM descrito o cualquier otra modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una mutación que da como resultado una sustitución del aminoácido arginina por glutamina en la posición 176 del aminoácido en la región 1 del polipéptido RYR2 (R176Q) (RYR2^{R176Q}).

15 En una modalidad de cualquier aspecto del iPSC-CM descrito o composición que comprende el iPSC-CM descrito o cualquier otra modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una mutación que da como resultado una sustitución del aminoácido ácido aspártico por asparagina en la posición 385 del aminoácido del polipéptido RYR2 (D385N) (RYR2^{D385N}).

20 En una modalidad de cualquier aspecto del iPSC-CM descrito o composición que comprende el iPSC-CM descrito o cualquier otra modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una mutación que da como resultado una sustitución del aminoácido serina por arginina en la posición 404 del aminoácido del polipéptido RYR2 (S404R) (RYR2^{S404R}).

25 En una modalidad de cualquier aspecto del iPSC-CM descrito o composición que comprende el iPSC-CM descrito o cualquier otra modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una mutación que da como resultado una sustitución del aminoácido glicina por serina en la posición 3946 de aminoácido del polipéptido RYR2 (G3946S) (RYR2^{G3946S}).

En una modalidad de cualquier aspecto del iPSC-CM descrito o composición que comprende el iPSC-CM descrito o cualquier otra modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una mutación en RYR2 en S2814. Por ejemplo, una mutación S2814A.

30 En una modalidad de cualquier aspecto del iPSC-CM descrito o composición que comprende el iPSC-CM descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una mutación en RYR2 en S2808. Por ejemplo, una mutación S2808A.

En una modalidad de cualquier aspecto del iPSC-CM descrito o composición que comprende el iPSC-CM descrito o cualquier otra modalidad anterior descrita, el iPSC-CM tiene una primera mutación en RYR2 en S2808 o S2814, y una segunda mutación en RYR2 que se presenta en la región 1 (residuos de aminoácidos 77-466), región 2 (residuos de aminoácidos 2246-2534), región 3 (residuos de aminoácidos 3778-4201) o región 4 (residuos de aminoácidos 4497-4959) del polipéptido RYR2. Por ejemplo, una primera mutación en RYR2 en S2808 o S2814, y una segunda mutación en R4651 o R176.

En una modalidad de cualquier aspecto del iPSC-CM descrito o composición que comprende el iPSC-CM descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, la mutación es una sustitución de aminoácidos. Por ejemplo, una sustitución de serina por alanina, o una sustitución de arginina por glutamina, o una sustitución de arginina por isoleucina.

En una modalidad de cualquier aspecto de la composición que comprende el iPSC-CM descrito o en cualquier modalidad anterior descrita, la composición comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

Taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT)

La taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) es una arritmia hereditaria causada predominantemente por una mutación autosómica dominante del gen que codifica el receptor 2 cardíaco de rianodina (RYR2), el principal canal intracelular de liberación de calcio de los cardiomiocitos. Por lo general, los pacientes con CPVT son asintomáticos en reposo pero desarrollan taquicardia ventricular potencialmente letal durante el ejercicio o angustia emocional. El potencial de acción cardíaca abre el canal de Ca^{2+} tipo L sensible al voltaje ubicado en la membrana plasmática. El influjo local resultante del Ca^{2+} abre el RYR2, posicionado en el retículo sarcoplásmico, liberando Ca^{2+} en el citosol donde desencadena la contracción del sarcómero. Cuando finaliza el potencial de acción cardíaca y la célula ingresa a la diástole, el RYR2 se cierra y el Ca^{2+} citosólico es bombeado nuevamente al retículo sarcoplásmico por el retículo sarcoplásmico Ca^{2+} -ATPasa.

Las mutaciones de CPVT aumentan la liberación diastólica de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico al citoplasma por RYR2. En cardiomiocitos individuales, el Ca^{2+} diastólico elevado induce un intercambio inverso de sodio y calcio a través del NCX1 en la membrana plasmática, lo que da como resultado despolarizaciones posteriores que potencialmente pueden desencadenar potenciales de acción adicionales. Se desconoce el mecanismo molecular

por el cual la estimulación por catecol desenmascara la naturaleza arrítmica de las mutaciones de CPVT, aunque se ha implicado la activación inducida por catecol de la proteína cinasa II dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII). Los mecanismos por los cuales la mutación RYR2 produce el fenotipo clínico de taquicardia ventricular también son inciertos, aunque una teoría es que la actividad desencadenada por los cardiomiocitos produce taquicardia ventricular.

El advenimiento de la tecnología de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) y los métodos eficientes para diferenciar las iPSC de los cardiomiocitos (iPSC-CM), han creado oportunidades interesantes para estudiar las arritmias hereditarias. Los iPSC-CM se han generado de pacientes con CPVT y otras arritmias hereditarias y se ha demostrado que capturan características clave de estas enfermedades, incluida la duración potencial de acción anormal y las respuestas a los medicamentos. Sin embargo, los estudios actuales se han limitado a células aisladas o grupos de células, dejando un gran vacío para modelar arritmias clínicas, que son las propiedades emergentes de las células ensambladas en el tejido miocárdico.

AIP y Análogos

También se incluyen en la invención vectores virales adenovirales o adeno-asociados que codifican los polipéptidos AIP o fragmentos de los mismos que se modifican de manera que mejoren o no inhiban su capacidad para modular el ritmo cardíaco. En una modalidad, la invención proporciona métodos para optimizar una secuencia de aminoácidos de AIP o una secuencia de ácido nucleico que produce una alteración. Tales cambios pueden incluir ciertas mutaciones, eliminaciones, inserciones, modificaciones post-traducción, y replicación en tándem. En una modalidad preferida, la secuencia de aminoácidos de AIP se modifica para mejorar la resistencia a la proteasa, particularmente la resistencia a metaloproteasas. De acuerdo con esto, la invención incluye además análogos de cualquier polipéptido presente de manera natural de la invención. Los análogos pueden diferir del polipéptido presente de manera natural de la invención por diferencias en la secuencia de aminoácidos, por modificaciones post-traducción o por ambas. Los análogos de la invención exhibirán generalmente al menos el 85%, de manera más preferible el 90%, y lo más preferiblemente el 95% o incluso el 99% de identidad con toda o parte de una secuencia de aminoácidos presente de manera natural de la invención. La longitud de la comparación de secuencias es de al

menos 10, 13, 15 residuos de aminoácidos. Nuevamente, en un enfoque ejemplar para determinar el grado de identidad, se puede usar un programa BLAST, con una puntuación de probabilidad entre e^{-3} y e^{-100} que indica una secuencia estrechamente relacionada. Las modificaciones incluyen derivatización química *in vivo* e *in vitro* de polipéptidos, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación o glicosilación; tales modificaciones pueden ocurrir durante la síntesis o procesamiento de polipéptidos o después del tratamiento con enzimas modificadoras aisladas. Los análogos también pueden diferir de los polipéptidos presentes de manera natural de la invención por alteraciones en la secuencia primaria. Estos incluyen variantes genéticas, tanto naturales como inducidas (por ejemplo, como resultado de mutagénesis aleatoria por irradiación o exposición a etanometilsulfato o por mutagénesis específica del sitio como se describe en Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2a ed.), CSH Press, 1989, o Ausubel et al., *Supra*). También se incluyen péptidos, moléculas y análogos ciclados que contienen residuos distintos a los L-aminoácidos, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos no presentes de manera natural o sintéticos, por ejemplo, aminoácidos beta o gamma.

Además de los polipéptidos de longitud completa, la invención también incluye fragmentos de cualquiera de los polipéptidos de la invención. Cuando se usa en la presente, el término “un fragmento” significa al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 aminoácidos de longitud. Los fragmentos de la invención pueden generarse por métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica o pueden resultar del procesamiento normal de proteínas (por ejemplo, eliminación de aminoácidos del polipéptido naciente que no son necesarios para la actividad biológica o eliminación de aminoácidos mediante empalme de ARNm alternativo o eventos alternativos de procesamiento de proteínas).

Se pueden administrar análogos de AIP no proteicos que tienen una estructura química diseñada para imitar la actividad funcional de AIP (por ejemplo, actividad reguladora cardíaca) de acuerdo con los métodos de la invención. Los análogos de AIP pueden exceder la actividad fisiológica del AIP nativo. Los métodos de diseño análogo son bien conocidos en la técnica, y la síntesis de análogos puede llevarse a cabo de acuerdo con tales métodos modificando las estructuras químicas de modo que los análogos resultantes exhiban la actividad inmunomoduladora de un AIP nativo. Estas modificaciones químicas incluyen, pero no se limitan a, sustituir grupos R alternativos y variar el grado de saturación en átomos de

carbono específicos del AIP nativo. Preferiblemente, los análogos de AIP son relativamente resistentes a la degradación *in vivo*, lo que da como resultado un efecto terapéutico más prolongado tras su administración. Los ensayos para medir la actividad funcional incluyen, entre otros, los descritos en los Ejemplos a continuación.

Esta invención también contempla métodos para aumentar la especificidad y la potencia de la inhibición de CaMKII en su acción sobre RYR2. Por ejemplo, el péptido inhibidor puede ser ubicado en RYR2 mediante la expresión de un módulo de unión a RYR2 que contiene proteínas de fusión y una secuencia inhibidora de CaMKII. El módulo de unión de RYR2 puede consistir en FKBP12.6 o un derivado de FKBP12.6.

Terapia con Polinucleótidos

La terapia con polinucleótidos que presenta un polinucleótido que codifica un péptido AIP, análogo, variante o fragmento del mismo es otro enfoque terapéutico para tratar una arritmia cardíaca (por ejemplo, CPVT). Se espera que la expresión de tales proteínas en una célula cardíaca module la función de la célula, tejido u órgano cardíaco, por ejemplo, al inhibir la fosforilación de RYR2, inhibir la actividad de CAMKII o regular de otro modo el ritmo cardíaco. Tales moléculas de ácido nucleico pueden suministrarse a las células de un sujeto que tiene una arritmia cardíaca. Las moléculas de ácido nucleico deben suministrarse a las células de un sujeto en una forma en la que las mismas puedan ser captadas de modo que puedan producirse niveles terapéuticamente efectivos de un péptido AIP o fragmento del mismo.

Los vectores virales transductores (por ejemplo, retrovirales, adenovirales y virales adeno-asociados) pueden usarse para la terapia génica de células somáticas, especialmente debido a su alta eficacia de infección e integración y expresión estables (ver, por ejemplo, Cayouette et al., Human Gene Therapy 8:423-430, 1997; Kido et al., Current Eye Research 15:833-844, 1996; Bloomer et al., Journal of Virology 71:6641-6649, 1997; Naldini et al., Science 272:263-267, 1996; y Miyoshi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94: 10319, 1997). Por ejemplo, un polinucleótido que codifica un péptido AIP, una variante o un fragmento del mismo, puede clonarse en un vector retroviral y la expresión puede ser dirigida desde su promotor endógeno, desde la repetición terminal larga retroviral o desde un promotor específico de un tipo de interés de célula diana. Otros vectores virales que pueden usarse incluyen, por ejemplo, un virus vaccinia, un virus del papiloma bovino o un virus del herpes,

tal como el Virus Epstein-Barr (ver también, por ejemplo, los vectores de Miller, *Human Gene Therapy* 15-14, 1990; Friedman, *Science* 244:1275-1281, 1989; Eglitis et al., *BioTechniques* 6:608-614, 1988; Tolstoshev et al., *Current Opinion in Biotechnology* 1:55-61, 1990; Sharp, *The Lancet* 337:1277-1278, 1991; Cornetta et al., *Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 36:311-322, 1987; Anderson, *Science* 226:401-409, 1984; Moen, *Blood Cells* 17:407-416, 1991; Miller et al., *Biotechnology* 7:980-990, 1989; Le Gal La Salle et al., *Science* 259:988-990, 1993; y Johnson, *Chest* 107:77S-83S, 1995). Los vectores retrovirales están particularmente bien desarrollados y se han utilizado en entornos clínicos (Rosenberg et al., *N. Engl. J. Med* 323:370, 1990; Anderson et al., *Patente de Estados Unidos No. 5,399,346*). En una modalidad, se usa un vector viral para administrar un polinucleótido que codifica un péptido AIP a un tejido cardíaco.

Los vectores virales transductores tienen tropismos tisulares que permiten la transducción selectiva de un tipo celular en comparación con otro. Por ejemplo, mientras que la inhibición de CAMKII en los cardiomiocitos será terapéutica para la CPVT u otras formas de enfermedad cardíaca, su inhibición en otros tejidos, tal como el cerebro, puede no ser deseable. En algunas modalidades, se usan vectores que se focalizan en cardiomiocitos con alta especificidad en comparación con otros tipos de células. Esto permitiría una focalización cardíaca específica de la expresión de la molécula del péptido inhibidor de CAMKII. Esto se debe a que la inhibición de CAMKII en otras células no cardíacas puede ser perjudicial. Entre los potenciales candidatos a virus adeno-asociados están AAV9, AAV6, AAV2i8, Anc80 y Anc82. La eficacia de la transducción de virus adeno-asociados se mejora cuando el genoma es “auto-complementario”. En algunas modalidades, el virus adeno-asociado auto-complementario se usa para aumentar la transducción cardíaca por medio del vector de terapia génica.

Los enfoques no virales también pueden emplearse para la introducción terapéutica en una célula cardíaca de un paciente que requiere la inhibición de la CPVT. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico puede introducirse en una célula administrando el ácido nucleico en presencia de lipofección (Feigner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7413, 1987; Ono et al., *Neuroscience Letters* 17:259, 1990; Brigham et al., *Am. J. Med. Sci.* 298:278, 1989; Staubinger et al., *Methods in Enzymology* 101:512, 1983), conjugación asialoorosomucoide-polilisina (Wu et al., *Journal of Biological Chemistry* 263:14621, 1988; Wu et al., *Journal of*

Biological Chemistry 264:16985, 1989), o por micro-inyección bajo condiciones quirúrgicas (Wolff et al., Science 247:1465, 1990). Preferiblemente, los ácidos nucleicos se administran en combinación con un liposoma y protamina.

La transferencia de genes también se puede lograr utilizando medios no virales que implican la transfección *in vitro*. Tales métodos incluyen el uso de fosfato de calcio, DEAE dextrano, electroporación y fusión de protoplastos. Los liposomas también pueden ser potencialmente beneficiosos para el suministro de ADN en una célula. El trasplante de genes normales en los tejidos afectados de un paciente también se puede lograr transfiriendo un ácido nucleico normal a un tipo de célula cultivable *ex vivo* (por ejemplo, una célula primaria autóloga o heteróloga o progenie de la misma), después de lo cual la célula (o sus descendientes) se inyectan en un tejido objetivo.

La expresión de ADNc para su uso en métodos de terapia con polinucleótidos se puede dirigir desde cualquier promotor adecuado (por ejemplo, el citomegalovirus (CMV) humano, el virus del simio 40 (SV40), el promotor híbrido de b-actina de CMV de pollos (“CAG”) o promotores de metalotioneína y regularse por cualquier elemento regulador de mamíferos apropiado. Para el tratamiento de CPVT, es deseable expresar selectivamente el inhibidor de CAMKII en los cardiomiocitos y minimizar su expresión en otros tipos de células. En algunas modalidades, los promotores selectivos de cardiomiocitos se usan para la expresión del péptido inhibidor de CAMKII. Los promotores o potenciadores utilizados pueden incluir, sin limitación, aquellos que se caracterizan como potenciadores de tejidos o células específicos. Por ejemplo, el promotor de troponina T cardíaca, el promotor de la cadena pesada de α -miosina (α -MHC), el promotor de la cadena ligera de miosina-2v (MLC-2v) o el promotor del NCX1 cardíaco pueden usarse para dirigir la expresión en los cardiomiocitos. Alternativamente, si se usa un clon genómico como un constructo o implante terapéutico, la regulación puede ser mediada por las secuencias reguladoras cognadas o, si se desea, por secuencias reguladoras derivadas de una fuente heteróloga, que incluyan cualquiera de los promotores o elementos reguladores descritos anteriormente.

Otro enfoque terapéutico incluido en la invención implica la administración de un inhibidor de CaMKII terapéutico recombinante, tal como un péptido AIP recombinante, variante o fragmento del mismo, ya sea directamente al sitio de un tejido afectado por una enfermedad potencial o real, o sistémicamente (por ejemplo, mediante cualquier técnica

convencional de administración de proteínas recombinantes). La dosificación del péptido administrado depende de una serie de factores, que incluyen el tamaño y la salud del paciente individual. Para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

Ensayos de Detección Selectiva

La invención proporciona métodos para modificar un ritmo cardíaco mediante la administración de un inhibidor de CAMKII, AIP o un análogo del mismo, o un polinucleótido que codifique el AIP. Aunque los ejemplos descritos en la presente abordan específicamente el uso de un vector AAV que codifica un péptido AIP, un experto en la técnica entiende que los métodos de la invención no están tan limitados. Prácticamente cualquier agente que inhiba la fosforilación de un canal de rianodina cardíaca (RyR2) mediante la CAMKII, puede emplearse en los métodos de la invención. Los inhibidores de CAMKII ejemplares se conocen en la técnica y se describen en la presente.

Los métodos de la invención son útiles para la detección selectiva de alto rendimiento y bajo costo de agentes candidatos que inhiban la CPVT o que regulen ventajosamente un ritmo cardíaco. Tales agentes pueden identificarse utilizando, por ejemplo, cardiomiocitos humanos derivados de iPSC que expresan accionadores o sensores optogenéticos. Un agente candidato que inhibe específicamente la CPVT, inhibe la fosforilación de CaMKII de RyR2 se aísla y se prueba su actividad en un ensayo *in vitro* o *in vivo* para determinar su capacidad de inhibir la CPVT, modular de forma deseable un ritmo cardíaco u otra función cardíaca. Un experto en la materia aprecia que los efectos de un agente candidato en una célula, tejido u órgano se comparan típicamente con una célula, tejido u órgano de control correspondiente que no está en contacto con el agente candidato. Por lo tanto, los métodos de detección selectiva incluyen comparar las propiedades de la célula en contacto con las propiedades de una célula de control no tratada.

Pueden usarse agentes que imitan los efectos del AIP, es decir, los agentes que inhiben la CPVT, inhiben la fosforilación de RyR2 mediante la CaMKII o regulan de otro modo un ritmo cardíaco, por ejemplo, como agentes terapéuticos para regular un ritmo cardíaco. Cada una de las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente también puede usarse en el descubrimiento y desarrollo de tales compuestos terapéuticos. Los péptidos

AIP codificados y sus análogos, después de su expresión, pueden usarse para prevenir la CPVT en un sujeto.

Compuestos de Prueba y Extractos

En general, los inhibidores de CaMKII, los análogos y miméticos del péptido AIP se identifican a partir de grandes bibliotecas de productos naturales o extractos sintéticos (o semi-sintéticos) o bibliotecas químicas o de bibliotecas de polipéptidos o ácidos nucleicos, de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica. Aquellos expertos en el campo del descubrimiento y desarrollo de fármacos comprenderán que la fuente precisa de los extractos o compuestos de prueba no es crítica para el(los) procedimiento(s) de detección selectiva de la invención. Los agentes utilizados en las detecciones selectivas pueden incluir aquellos conocidos como agentes terapéuticos para el tratamiento de arritmias cardíacas. De manera alternativa, se puede seleccionar prácticamente cualquier número de extractos o compuestos químicos desconocidos utilizando los métodos descritos en la presente. Los ejemplos de tales extractos o compuestos incluyen, entre otros, extractos de origen vegetal, fúngico, procariota o animal, caldos de fermentación y compuestos sintéticos, así como la modificación de polipéptidos existentes.

Las bibliotecas de polipéptidos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles comercialmente de varias fuentes, incluyendo Biotics (Sussex, Reino Unido), Xenova (Slough, Reino Unido), Harbour Branch Oceanographics Institute (Ft. Pierce, Fla.), y PharmaMar, E.U.A. (Cambridge, Mass.). Tales polipéptidos pueden modificarse para incluir un dominio de transducción de proteínas usando los métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente. Además, las bibliotecas producidas de forma natural y sintética se producen, si se desea, de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante métodos estándar de extracción y fraccionamiento. Se pueden encontrar ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares en la técnica, por ejemplo, en: DeWitt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* 90:6909, 1993; Erb *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 91:11422, 1994; Zuckermann *et al.*, *J. Med. Chem* 37:2678, 1994; Cho *et al.*, *Science* 261:1303, 1993; Carrell *et al.*, *Angew. Chem Int. Ed. Engl.* 33:2059, 1994; Carell *et al.*, *Angew. Chem Int. Ed. Engl.* 33:2061, 1994; y Gallop *et al.*, *J. Med. Chem* 37:1233, 1994. Además, si se desea, cualquier biblioteca o compuesto se modifica fácilmente usando métodos químicos, físicos o bioquímicos estándar.

También están disponibles numerosos métodos para generar síntesis aleatorias o dirigidas (por ejemplo, semi-síntesis o síntesis total) de cualquier número de polipéptidos, compuestos químicos, que incluyen, entre otros, compuestos a base de sacáridos, lípidos, péptidos y ácido nucleico. Las bibliotecas de compuestos sintéticos están disponibles comercialmente en Brandon Associates (Merrimack, N.H.) y Aldrich Chemical (Milwaukee, Wis.). Alternativamente, los compuestos químicos que se utilizarán como compuestos candidatos se pueden sintetizar a partir de materiales de partida fácilmente disponibles utilizando técnicas y metodologías sintéticas estándar conocidas por aquellos expertos en la técnica. Las transformaciones químicas sintéticas y las metodologías de grupos protectores (protección y desprotección) útiles para sintetizar los compuestos identificados por los métodos descritos en la presente son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, aquéllos descritos en R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T. W. Greene y P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2a ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser y M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); y L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995), y las ediciones posteriores de las mismas.

Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en solución (por ejemplo, Houghten, *Biotechniques* **13**:412-421, 1992), o en perlas (Lam, *Nature* **354**:82-84, 1991), trozos (Fodor, *Nature* **364**:555-556, 1993), bacterias (Ladner, Patente de Estados Unidos No. 5,223,409), esporas (Ladner Patente de Estados Unidos No. 5,223,409), plásmidos (Cull *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EUA* **89**:1865-1869, 1992) o en fagos (Scott y Smith, *Science* **249**:386-390, 1990; Devlin, *Science* **249**:404-406, 1990; Cwirla *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**:6378-6382, 1990; Felici, *J. Mol. Biol.* **222**:301-310, 1991; Ladner *supra*).

Además, los expertos en la técnica del descubrimiento y desarrollo de fármacos comprenden fácilmente que los métodos para la desreplicación (por ejemplo, desreplicación taxonómica, desreplicación biológica y desreplicación química, o cualquier combinación de las mismas) o la eliminación de réplicas o repeticiones de materiales ya conocidos por su actividad, debe emplearse siempre que sea posible.

Cuando se descubre que un extracto crudo tiene actividad reguladora del ritmo cardíaco o actividad inhibitoria de CAMKII, es necesario un fraccionamiento adicional del extracto de plomo positivo para aislar los constituyentes moleculares responsables del efecto

observado. Por lo tanto, el objetivo del proceso de extracción, fraccionamiento y purificación es la caracterización e identificación cuidadosas de una entidad química dentro del extracto crudo que tiene la actividad deseada. Los métodos de fraccionamiento y purificación de tales extractos heterogéneos son conocidos en la técnica. Si se desea, los compuestos que se muestran útiles como agentes terapéuticos se modifican químicamente de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

Métodos Terapéuticos

Los agentes identificados como un inhibidor de CaMKII, que tienen actividad mimética de AIP (por ejemplo, actividad inhibidora de CaMKII, actividad reguladora del ritmo cardíaco) y/o polinucleótidos que codifican un AIP o análogo de AIP son útiles para prevenir o mejorar la CPVT u otra arritmia cardíaca. Las enfermedades y trastornos caracterizados por arritmia cardíaca pueden tratarse usando los métodos y composiciones de la invención.

En un enfoque terapéutico, un agente identificado como se describe en la presente se administra en el sitio de un tejido afectado por la enfermedad potencial o real o se administra sistémicamente. La dosificación del agente administrado depende de una serie de factores, que incluyen el tamaño y la salud del paciente individual. Para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones.

Terapéutica Farmacéutica

La invención proporciona un medio simple para identificar composiciones (incluyendo polinucleótidos, péptidos, inhibidores de moléculas pequeñas y miméticos de AIP) que tengan actividad inhibidora de CaMKII y/o actividad reguladora del ritmo cardíaco. De acuerdo con esto, una entidad química descubierta que tenga valor medicinal usando los métodos descritos en la presente es útil como fármaco o como información para la modificación estructural de compuestos existentes, por ejemplo, mediante diseño racional de fármacos. Tales métodos son útiles para los agentes de detección selectiva que tienen un efecto sobre una variedad de afecciones caracterizadas por una arritmia cardíaca.

Para usos terapéuticos, las composiciones o agentes identificados usando los métodos dados a conocer en la presente pueden administrarse sistémicamente, por ejemplo, formulados

en un amortiguador farmacéuticamente aceptable tal como solución salina fisiológica. Las vías de administración preferibles incluyen, por ejemplo, inyecciones subcutáneas, intravenosas, inter-peritoneales, intramusculares o intradérmicas que proporcionan niveles continuos y sostenidos del fármaco en el paciente. Para la terapia génica con AAV, la administración puede ser intravenosa o intra-coronaria. El tratamiento de pacientes humanos u otros animales se llevará a cabo utilizando una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente terapéutico identificado en la presente en un portador fisiológicamente aceptable. Los portadores adecuados y su formulación se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences por E. W. Martin. La cantidad del agente terapéutico a administrar varía dependiendo de la forma de administración, la edad y peso corporal del paciente, y con los síntomas clínicos de la arritmia cardíaca. Generalmente, las cantidades estarán en el rango de aquéllas usadas para otros agentes usados en el tratamiento de otras enfermedades que requieren la regulación de la función cardíaca, aunque en ciertos casos se necesitarán cantidades menores debido a la especificidad incrementada del compuesto. Un compuesto se administra a una dosificación que tiene actividad inhibidora de CAMKII o actividad reguladora del ritmo cardíaco según se determina mediante un método conocido por un experto en la técnica, o usando cualquiera de esos ensayos que miden la expresión o la actividad biológica de un polipéptido de CAMKII.

Formulación de Composiciones Farmacéuticas

La administración de un compuesto para el tratamiento de la arritmia cardíaca puede ser por cualquier medio adecuado que dé como resultado una concentración del agente terapéutico que, combinado con otros componentes, sea efectiva para mejorar, reducir o estabilizar una arritmia cardíaca. El compuesto puede estar contenido en cualquier cantidad apropiada en cualquier sustancia portadora adecuada, y generalmente está presente en una cantidad de 1-95% en peso del peso total de la composición. La composición puede proporcionarse en una forma de dosificación que sea adecuada para la vía de administración parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intramuscular o intra-peritonealmente). Las composiciones farmacéuticas pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional (ver, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20a ed.), ed. A. R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 y Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York).

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden formularse para liberar el compuesto activo de manera sustancial inmediatamente después de la administración o en cualquier momento o período de tiempo predeterminado después de la administración. Los últimos tipos de composiciones se conocen generalmente como

5 formulaciones de liberación controlada, que incluyen (i) formulaciones que crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un período prolongado de tiempo; (ii) formulaciones que después de un tiempo de retraso predeterminado crean una concentración sustancialmente constante del fármaco dentro del cuerpo durante un período prolongado de tiempo; (iii) formulaciones que mantienen la acción durante un período

10 de tiempo predeterminado al mantener un nivel relativamente constante y efectivo en el cuerpo con la minimización concomitante de los efectos secundarios indeseables asociados con las fluctuaciones en el nivel plasmático de la sustancia activa (patrón cinético serrado); (iv) formulaciones que localizan la acción mediante, por ejemplo, la colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente o en contacto con el timo; (v) formulaciones

15 que permiten una dosificación conveniente, de modo que se administren dosis, por ejemplo, una vez cada una o dos semanas; y (vi) formulaciones que focalizan una arritmia cardíaca mediante el uso de portadores o derivados químicos para suministrar el agente terapéutico a un tipo de célula particular (por ejemplo, célula cardíaca). Para algunas aplicaciones, las formulaciones de liberación controlada evitan la necesidad de dosificación frecuente durante el

20 día para mantener el nivel plasmático a un nivel terapéutico.

Se puede seguir cualquiera de varias estrategias con el fin de obtener una liberación controlada en la que el índice de liberación sea mayor que el índice de metabolismo del compuesto en cuestión. En un ejemplo, la liberación controlada se obtiene mediante la selección apropiada de diversos parámetros e ingredientes de la formulación, incluyendo, por

25 ejemplo, diversos tipos de composiciones y recubrimientos de liberación controlada. Por lo tanto, el agente terapéutico se formula con excipientes apropiados en una composición farmacéutica que, tras su administración, libera el agente terapéutico de manera controlada. Los ejemplos incluyen composiciones de tabletas o cápsulas de una o varias unidades, soluciones oleosas, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, microesferas, complejos

30 moleculares, nanopartículas, parches y liposomas.

Composiciones Parenterales

La composición farmacéutica puede administrarse por vía parenteral mediante inyección, infusión o implantación (subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intra-coronaria o similares) en formas de dosificación, formulaciones, o mediante dispositivos de suministro adecuados o implantes que contengan portadores y adyuvantes convencionales no tóxicos farmacéuticamente aceptables. La formulación y preparación de tales composiciones son bien conocidas por aquellos expertos en la técnica de la formulación farmacéutica. Las formulaciones se pueden encontrar en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, supra.

Las composiciones para uso parenteral se pueden proporcionar en formas de dosificación unitarias (por ejemplo, en ampollitas de dosis única) o en viales que contengan varias dosis y en las que se puede agregar un conservante adecuado (ver más abajo). La composición puede estar en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión o un dispositivo de suministro para implantación, o puede presentarse como un polvo seco para reconstituirse con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Además del agente activo que reduce o mejora una arritmia cardíaca, la composición puede incluir portadores y/o excipientes parenteralmente aceptables adecuados. El(los) agente(s) terapéutico(s) activo(s) puede(n) incorporarse en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas o similares para una liberación controlada. Además, la composición puede incluir agentes de suspensión, solubilización, estabilización, de ajuste del pH, ajuste de la tonicidad y/o agentes dispersantes.

Como se indicó anteriormente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden estar en la forma adecuada para inyección estéril. Para preparar tal composición, el(los) agente(s) terapéutico(s) adecuado(s) se disuelve(n) o suspende(n) en un vehículo líquido parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden emplearse se encuentran el agua, agua ajustada a un pH adecuado mediante la adición de una cantidad apropiada de ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o un amortiguador adecuado, 1,3-butanodiol, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio y solución de dextrosa. La formulación acuosa también puede contener uno o más conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo, etilo o n-propilo). En los casos en que uno de los compuestos es ligeramente soluble o poco soluble en agua, se puede agregar un agente de

mejora o solubiliza la disolución, o el solvente puede incluir 10-60% p/p de propilenglicol o similares.

Composiciones Parenterales de Liberación Controlada

Las composiciones parenterales de liberación controlada pueden estar en forma de suspensiones acuosas, microesferas, microcápsulas, microesferas magnéticas, soluciones oleosas, suspensiones oleosas o emulsiones. Alternativamente, el fármaco activo puede incorporarse en portadores biocompatibles, liposomas, nanopartículas, implantes o dispositivos de infusión.

Los materiales para usarse en la preparación de microesferas y/o microcápsulas son, por ejemplo, polímeros biodegradables/bioerosionables tales como poligalactina, poli(cianoacrilato de isobutilo), poli(2-hidroxietil-L-glutamina) y poli(ácido láctico). Los portadores biocompatibles que pueden usarse al formular una formulación parenteral de liberación controlada son carbohidratos (por ejemplo, dextranos), proteínas (por ejemplo, albúmina), lipoproteínas o anticuerpos. Los materiales para su uso en implantes pueden ser no biodegradables (por ejemplo, polidimetil-siloxano) o biodegradables (por ejemplo, poli(caprolactona), poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) o poli(orto-ésteres) o combinaciones de los mismos).

Formas Sólidas de Dosificación Para Uso Oral

Las formulaciones para uso oral incluyen tabletas que contienen el(los) ingrediente(s) activo(s) en una mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables. Tales formulaciones son conocidas por el experto en la técnica. Los excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o cargas inertes (por ejemplo, sacarosa, sorbitol, azúcar, manitol, celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, carbonato de calcio, cloruro de sodio, lactosa, fosfato de calcio, sulfato de calcio o fosfato de sodio); agentes de granulación y desintegración (por ejemplo, derivados de celulosa que incluyen celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, croscarmelosa de sodio, alginatos o ácido algínico); agentes aglutinantes (por ejemplo, sacarosa, glucosa, sorbitol, acacia, ácido algínico, alginato de sodio, gelatina, almidón, almidón pre-gelatinizado, celulosa microcristalina, silicato de aluminio y magnesio, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilenglicol); y agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de zinc, ácido

esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados, o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes aromatizantes, plastificantes, humectantes, agentes amortiguadores y similares.

Las tabletas pueden no estar recubiertas o pueden ser recubiertas mediante técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la desintegración y absorción en el tracto gastrointestinal y, por lo tanto, proporcionar una acción sostenida durante un período más largo. El recubrimiento puede adaptarse para liberar el fármaco activo en un patrón predeterminado (por ejemplo, con el fin de lograr una formulación de liberación controlada) o puede adaptarse para no liberar el fármaco activo hasta después de su paso por el estómago (recubrimiento entérico). El recubrimiento puede ser un recubrimiento de azúcar, un recubrimiento de película (por ejemplo, a base de hidroxipropil-metilcelulosa, metilcelulosa, metil-hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona), o un recubrimiento entérico (por ejemplo, a base de copolímeros de ácido metacrílico, ftalato de acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato de acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de acetato de polivinilo, goma laca y/o etilcelulosa). Además, se puede emplear un material de retardo de tiempo, tal como, por ejemplo, monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones de tabletas sólidas pueden incluir un recubrimiento adaptado para proteger la composición de cambios químicos no deseados (por ejemplo, degradación química antes de la liberación del activo de la sustancia terapéutica activa cardíaca). El recubrimiento puede aplicarse sobre la forma de dosificación sólida de manera similar a la descrita en la Enciclopedia de Tecnología Farmacéutica, supra.

En una modalidad, dos o más terapias cardíacas se pueden mezclar juntas en la tableta, o se pueden dividir. En un ejemplo, la primera terapéutica cardíaca activa está contenida en el interior de la tableta, y la segunda terapéutica activa está en el exterior, de modo que una parte sustancial de la segunda terapéutica se libere antes de la liberación de la primera terapéutica activa.

Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como tabletas masticables, o como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, almidón de patata, lactosa, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o como cápsulas de gelatina blanda en las que

el ingrediente activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo, aceite de maní, parafina líquida o aceite de oliva. Los polvos y granulados pueden prepararse usando los ingredientes mencionados anteriormente en tabletas y cápsulas de una manera convencional usando, por ejemplo, un mezclador, un aparato de lecho fluido o un equipo de secado por pulverización.

Formas de Dosificación Oral de Liberación Controlada

Las composiciones de liberación controlada para uso oral pueden, por ejemplo, construirse para liberar la terapéutica cardíaca activa controlando la disolución y/o la difusión de la sustancia activa. La liberación controlada de disolución o difusión se puede lograr mediante el recubrimiento apropiado de una formulación para tabletas, cápsulas, gránulos o granulados de compuestos, o incorporando el compuesto en una matriz apropiada. Un recubrimiento de liberación controlada puede incluir una o más de las sustancias de recubrimiento mencionadas anteriormente y/o, por ejemplo, goma laca, cera de abejas, cera glicólica, cera de ricino, cera de carnauba, alcohol estearílico, monoestearato de glicerilo, diestearato de glicerilo, palmitostearato de glicerol, etilcelulosa, resinas acrílicas, ácido dl-poliláctico, butirato de acetato de celulosa, cloruro de polivinilo, acetato de polivinilo, vinilpirrolidona, polietileno, polimetacrilato, metilmetacrilato, 2-hidroximetacrilato, hidrogeles de metacrilato, 1,3-butilenoglicol, metacrilato de etilenglicol y/o polietilenglicoles. En una formulación de matriz de liberación controlada, el material de matriz también puede incluir, por ejemplo, metilcelulosa hidratada, cera de carnauba y alcohol estearílico, carbopol 934, silicona, triestearato de glicerilo, acrilato de metilo-metacrilato de metilo, cloruro de polivinilo, polietileno y/o fluorocarbono halogenado.

Una composición de liberación controlada que contiene uno o más compuestos terapéuticos también puede estar en forma de una tableta o cápsula flotante (es decir, una tableta o cápsula que, tras la administración oral, flota sobre el contenido gástrico durante un cierto período de tiempo). Se puede preparar una formulación de tableta flotante del(los) compuesto(s) granulando una mezcla del(los) compuesto(s) con excipientes y 20-75% p/p de hidrocoloides, tales como hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa o hidroxipropilmetilcelulosa. Los gránulos obtenidos se pueden comprimir entonces en tabletas. En contacto con el jugo gástrico, la tableta forma una barrera de gel sustancialmente impermeable al agua alrededor de su superficie. Esta barrera de gel participa en el

mantenimiento de una densidad de menos de uno, permitiendo así que la tableta permanezca flotante en el jugo gástrico.

Terapias de Combinación

Opcionalmente, se puede administrar una terapia cardíaca descrita en la presente (por ejemplo, inhibidor de CAMKII, péptido AIP o polinucleótido) en combinación con cualquier otra terapia estándar útil para regular la función cardíaca; tales métodos son conocidos por el experto en la técnica y descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences por E. W. Martin.

Edición del Genoma de RYR2 Mutante

Debido a que los sujetos que comprenden una mutación RYR2 están predispuestos a la CPVT, sería deseable reparar específicamente el gen defectuoso que codifica el polipéptido RYR2. La edición de genes terapéuticos es el enfoque principal de la investigación biomédica, que abarca la interfaz entre la ciencia básica y la clínica. Una gran cantidad de diferentes síndromes de enfermedades humanas hereditarias recesivas son causados por la herencia de mutaciones puntuales de inactivación bialélicas de genes de enfermedades. El desarrollo de nuevas herramientas de “edición de genes” proporciona la capacidad de manipular la secuencia de ADN de una célula en un locus cromosómico específico, sin introducir mutaciones en otros sitios del genoma. Esta tecnología efectivamente permite al investigador manipular el genoma de las células de un sujeto *in vitro* o *in vivo*, para efectuar una reversión de un genotipo perjudicial (por ejemplo, el gen que codifica RYR2^{R4651I}). Alternativamente, dado que los inventores han descubierto que la fosforilación de RYR2-S2814 por CAMKII desenmascara las mutaciones de CPVT, y que la mutación RYR2-S2814A es protectora, la edición del gen terapéutico puede implicar la introducción de una mutación S2814A en los cardiomiocitos del paciente para que los mismos sean menos vulnerables a la arritmia.

En una modalidad, la edición de genes implica focalizar una endonucleasa (una enzima que causa rupturas de ADN internamente dentro de una molécula de ADN) en un sitio específico del genoma y, por lo tanto, desencadenar la formación de una ruptura cromosómica de doble hebra (DSB) en el sitio elegido. Si, junto con la introducción de las rupturas cromosómicas, se introduce una molécula de ADN donante (por ejemplo, mediante la introducción de plásmidos u oligonucleótidos), pueden producirse interacciones entre el cromosoma roto y el ADN introducido, especialmente si las dos secuencias comparten homología. En este caso, puede ocurrir un proceso denominado “focalización genética”, en la

que los extremos del ADN del cromosoma invaden secuencias homólogas del ADN del donante por recombinación homóloga (HR). Al usar la secuencia de plásmido donante como plantilla para la HR, se puede lograr una reparación perfecta de la DSB cromosómica. Es importante destacar que, si la molécula de ADN donante difiere ligeramente de la secuencia cromosómica, la reparación de DSB mediada por HR introducirá la secuencia donante en el cromosoma, lo que dará como resultado la conversión génica/corrección genética del locus cromosómico. En el contexto de la focalización génica terapéutica, la secuencia alterada elegida sería un fragmento activo o funcional (por ejemplo, cepa natural, normal) del gen de interés de la enfermedad. Al focalizar la nucleasa en un sitio genómico que contiene la mutación puntual que causa la enfermedad, el concepto es utilizar la formación de DSB para estimular la HR y reemplazar así la secuencia de la enfermedad mutante con la secuencia de cepa natural (corrección genética). La ventaja de la vía HR es que tiene el potencial de generar sin problemas una copia de cepa natural del gen en lugar del alelo mutante anterior.

Las herramientas actuales de edición del genoma utilizan la inducción de roturas de doble hebra (DSBs) para mejorar la manipulación genética de las células. Tales métodos incluyen nucleasas de dedos de zinc (ZFNs; se describe por ejemplo en las Patentes de Estados Unidos Nos. 6,534,261, 6,607,882, 6,746,838, 6,794,136, 6,824,978, 6,866,997, 6,933,113, 6,979,539, 7,013,219, 7,030,215, 7,220,719, 7,241,573, 7,241,574, 7,585,849, 7,595,376, 6,903,185, y 6,479,626, y las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nos. 20030232410 y US2009020314, que se incorporan en la presente como referencia), Nucleasas Efectoras de Tipo Activadoras de la Transcripción (TALENs; descritas, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 8,440,431, 8,440,432, 8,450,471, 8,586,363, and 8,697,853, y las Publicaciones de Patente de Estados Unidos Nos. 20110145940, 20120178131, 20120178169, 20120214228, 20130122581, 20140335592 y 20140335618, que se incorporan en la presente como referencia), y el sistema de CRISPR (Repeticiones Palindrómicas Cortas Inter-Espaciadas Regularmente Agrupadas)/Cas9 (descrito por ejemplo en las Patentes de Estados Unidos Nos. 8,697,359, 8,771,945, 8,795,965, 8,871,445, 8,889,356, 8,906,616, 8,932,814, 8,945,839, 8,993,233, 8,999,641, y las Publicaciones de Patentes de Estados Unidos Nos. 20140170753, 20140227787, 20140179006, 20140189896, 20140273231, 20140242664, 20140273232, 20150184139, 20150203872, 20150031134, 20150079681, 20150232882 y 20150247150, que se incorporan en la presente como referencia). Por ejemplo, las capacidades

de reconocimiento de secuencia de ADN de la ZFN y su especificidad pueden ser impredecibles. De manera similar, las TALENs y el CRISPR/Cas9 se separan no solo en el sitio deseado, sino también a menudo en otros sitios “fuera del objetivo”. Estos métodos tienen problemas importantes relacionados con la inducción de rupturas de doble hebra fuera del objetivo y el potencial de mutaciones perjudiciales, incluidos inserciones o eliminaciones, reordenamientos genómicos y reordenamientos cromosómicos, asociados con estos efectos fuera del objetivo. Las ZFN y TALENs implican el uso de proteínas vinculantes al ADN de secuencia modulares específicas para generar especificidad en secuencias de ~18 pb en el genoma.

La edición del genoma mediada por nucleasas guiadas por ARN, se basa en los sistemas CRISPR (Repetición Palindrómica Corta Inter-Espaciada Agrupada Regularmente) Tipo 2/Cas (CRISPR Asociado), ofrece un enfoque valioso para alterar el genoma. En resumen, la Cas9, una nucleasa guiada por ARN de una sola guía (ARNsg), se une a un locus genómico objetivo junto al motivo adyacente proto-espaciador (PAM) y genera una ruptura de doble hebra (DSB). Entonces, la DSB se repara ya sea mediante una unión del extremo no homólogo (NHEJ), lo que conduce a mutaciones de inserción/eliminación (indel), o mediante reparación dirigida por homología (HDR), que requiere una plantilla exógena y puede generar una modificación precisa en un locus objetivo (Mali et al., Science. 15 de febrero de 2013; 339(6121):823-6). A diferencia de otros métodos de terapia génica, que agregan una copia funcional o parcialmente funcional de un gen a las células de un paciente, aunque retienen la copia disfuncional original del gen, este sistema puede eliminar el defecto. La corrección genética usando nucleasas diseñadas ha sido demostrada en células de cultivo de tejidos y modelos de roedores de enfermedades raras.

La CRISPR se ha utilizado en una amplia gama de organismos, incluyendo levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*), pez cebra, nematodos (*Caenorhabditis elegans*), plantas, ratones y varios otros organismos. Además, la CRISPR se ha modificado para crear factores de transcripción programables que permitan a los científicos focalizar y activar o silenciar genes específicos. Las bibliotecas de decenas de miles de ARNs guía están ahora disponibles.

Desde 2012, el sistema CRISPR/Cas se ha utilizado para la edición de genes (para silenciar, mejorar o cambiar genes específicos) que incluso funciona en eucariotas como

ratones y primates. Al insertar un plásmido que contiene genes cas y CRISPRs diseñadas específicamente, el genoma de un organismo se puede cortar en cualquier ubicación deseada.

Las repeticiones CRISPR varían en tamaño de 24 a 48 pares base. Por lo general, las mismas muestran cierta simetría de díada, lo que implica la formación de una estructura secundaria, tal como una horquilla, aunque no son realmente palindrómicas. Las repeticiones están separadas por separadores de longitud similar. Algunas secuencias espaciadoras de CRISPR coinciden exactamente con las secuencias de plásmidos y fagos, aunque algunos separadores coinciden con el genoma del procariota (separadores auto-focalizados). Se pueden agregar nuevos separadores rápidamente en respuesta a la infección del fago.

Los genes (cas) asociados con CRISPR a menudo están asociados con matrices de separadores de repetición CRISPR. Desde 2013, se han descrito más de cuarenta familias diferentes de proteínas Cas. De estas familias de proteínas, la Cas1 parece estar omnipresente entre los diferentes sistemas CRISPR/Cas. Se han utilizado combinaciones particulares de genes cas y estructuras repetidas para definir 8 subtipos de CRISPR (Ecoli, Ypest, Nmeni, Dvulg, Tneap, Hmari, Apern y Mtube), algunos de los cuales están asociados con un módulo genético adicional que codifica proteínas misteriosas asociadas con repeticiones (RAMPs). Más de un subtipo de CRISPR puede presentarse en un solo genoma. La distribución esporádica de los subtipos de CRISPR/Cas sugiere que el sistema está sujeto a la transferencia horizontal de genes durante la evolución microbiana.

El ADN exógeno aparentemente es procesado por proteínas codificadas por los genes Cas en elementos pequeños (aproximadamente 30 pares base de longitud), que luego se insertan de alguna manera en el locus de CRISPR cerca de la secuencia líder. Los ARNs de los locus o puntos de CRISPR se expresan constitutivamente y son procesados por las proteínas Cas en pequeños ARNs compuestos de elementos de secuencia individuales derivados de forma exógena con una secuencia de repetición de flaqueo. Los ARNs guían a otras proteínas Cas para silenciar elementos genéticos exógenos a nivel de ARN o ADN. La evidencia sugiere diversidad funcional entre los subtipos de CRISPR. Las proteínas Cse (Cas subtipo Ecoli) (denominadas CasA-E en *E. coli*) forman un complejo funcional, Cascade, que procesa transcritos del ARN de CRISPR en unidades separadoras de repetición que Cascade retiene. En otros procariotas, la Cas6 procesa los transcritos de CRISPR. Curiosamente, la inactivación de fagos basada en CRISPR en *E. coli* requiere Cascade y Cas3, pero no Cas1 y

Cas2. Las proteínas Cmr (módulo Cas RAMP) que se encuentran en *Pyrococcus furiosus* y otros procariotas forman un complejo funcional con pequeños ARNs de CRISPR que reconoce y escinde ARNs diana complementarios. Las enzimas de CRISPR guiadas por ARN se clasifican como enzimas de restricción de tipo V.

- 5 Ver también la Publicación de Patente de Estados Unidos 2014/0068797, que se incorpora como referencia en su totalidad.

Cas9

La Cas9 es una nucleasa, una enzima especializada para cortar ADN, con dos sitios de corte activos, uno para cada hebra de la doble hélice. El equipo demostró que podía
10 desactivar uno o ambos sitios mientras preservaban la capacidad de la Cas9 de ubicar su ADN diana. Jinek et al. (2012) combinaron ARNtracr y ARN espaciador en una molécula de “ARN de guía única” que, mezclada con Cas9, podría encontrar y cortar los objetivos de ADN correctos. Se ha propuesto que tales ARNs guía sintéticos podrían usarse para la edición de genes (Jinek et al., Science. 17 de agosto de 2012; 337(6096):816-21).

15 Las proteínas Cas9 están altamente enriquecidas en bacterias patógenas y comensales. La regulación génica mediada por CRISPR/Cas puede contribuir a la regulación de genes bacterianos endógenos, particularmente durante la interacción bacteriana con hospederos eucariotas. Por ejemplo, la proteína Cas, Cas9, de *Francisella novicida* utiliza un único ARN pequeño asociado a CRISPR/Cas (ARNsca) para reprimir un transcripto endógeno que
20 codifica una lipoproteína bacteriana que es crítica para *F. novicida* para amortiguar la respuesta del hospedero y promover la virulencia. La co-inyección de ARNm y ARNsgs de Cas9 en la línea germinal (cigotos) generó ratones con mutaciones. También se contempla el suministro de secuencias de ADN de Cas9.

ARNg

25 Como una proteína guiada por ARN, la Cas9 requiere un ARN corto para dirigir el reconocimiento de los objetivos de ADN. Aunque Cas9 examina preferentemente secuencias de ADN que contienen una secuencia NGG de PAM, la misma puede unirse aquí sin un objetivo proto-separador. Sin embargo, el complejo de Cas9-gRNA requiere una coincidencia estrecha con el ARNg para crear una ruptura de doble hebra. Las secuencias de CRISPR en
30 bacterias se expresan en múltiples ARNs y luego se procesan para crear hebras guía para ARN. Debido a que los sistemas eucariotas carecen de algunas de las proteínas necesarias para

procesar ARNs de CRISPR, el ARNg de construcción sintética se creó para combinar las piezas esenciales de ARN para la focalización de Cas9 en un solo ARN expresado con el promotor U6 de tipo 2I de la polimerasa del ARN). Los ARNgs sintéticos tienen un poco más de 100 pb en la longitud mínima y contienen una porción que focaliza los 20 nucleótidos proto-separadores que preceden inmediatamente a la secuencia NGG de PAM; los ARNgs no contienen una secuencia PAM.

En un enfoque, se alteran una o más células de un sujeto para expresar una forma de tipo natural de RYR2^{R4651I} usando un sistema CRISPR-Cas. La Cas9 puede usarse para focalizar un RYR2^{R4651I} que comprende una mutación. Tras el reconocimiento del objetivo, la Cas9 induce roturas de doble hebra en el gen diana RYR2^{R4651I}. La reparación dirigida por homología (HDR) en el sitio de ruptura de doble hebra puede permitir la inserción de una secuencia RYR2^{R4651I} de tipo natural deseada.

Las siguientes patentes y publicaciones de patente de Estados Unidos se incorporan en la presente como referencia: Patente No. 8,697,359, 20140170753, 20140179006, 20140179770, 20140186843, 20140186958, 20140189896, 20140227787, 20140242664, 20140248702, 20140256046, 20140273230, 20140273233, 20140273234, 20140295556, 20140295557, 20140310830, 20140356956, 20140356959, 20140357530, 20150020223, 20150031132, 20150031133, 20150031134, 20150044191, 20150044192, 20150045546, 20150050699, 20150056705, 20150071898, 20150071899, 20150071903, 20150079681, 20150159172, 20150165054, 20150166980, y 20150184139.

La práctica de la presente invención emplea, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro del alcance del experto en la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la literatura, tal como “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, segunda edición (Sambrook, 1989); “Oligonucleotide Synthesis” (Gait, 1984); “Animal Cell Culture” (Freshney, 1987); “Methods in Enzymology” “Handbook of Experimental Immunology” (Weir, 1996); “Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells” (Miller y Calos, 1987); “Current Protocols in Molecular Biology” (Ausubel, 1987); “PCR: The Polymerase Chain Reaction”, (Mullis, 1994); “Current Protocols in Immunology” (Coligan, 1991). Estas técnicas son aplicables a la producción de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención, y, como tales, pueden considerarse al hacer

y practicar la invención. Se abordarán técnicas particularmente útiles para modalidades particulares en las secciones que siguen.

Los siguientes ejemplos se presentan con el fin de proporcionar a los expertos en la técnica una exposición completa y una descripción de cómo hacer y usar el ensayo, detección selectiva y métodos terapéuticos de la invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: CPVT Isogénica (PGP1-RYR2^{R4651I})

Se obtuvieron fibroblastos de piel de un paciente con CPVT. Este paciente tenía un electrocardiograma normal en reposo, pero taquicardia ventricular polimórfica inducida por ejercicio. El genotipo reveló que el paciente tenía una mutación puntual en *RYR2* que causó la sustitución de isoleucina por arginina en la posición 4651 (R4651I; FIGS. 19A-19C). El genotipo clínico no implicó otros genes candidatos de arritmia heredada. Los fibroblastos se reprogramaron en iPSCs (línea CPVTp, donde p indica derivado del paciente; FIGS. 20A-20D), que se diferenciaron de manera sólida en iPSC-CMs con una eficiencia comparable a la línea PGP1 de iPSC de cepa natural (FIGS. 1A, 20E-20F). Se usó la edición del genoma Cas9 para introducir la mutación del paciente en PGP1, que produce CPVT isogénica (PGP1-RYR2^{R4651I}, CPVTe abreviada, donde e denota modificado con ingeniería genética) y líneas de control (PGP1, WT abreviada) (FIG. 20G).

El manejo del Ca^{2+} de iPSC-CMs de cepa natural (WT), CPVTp y CPVTe se analizó mediante la carga de islas de células aisladas que latían espontáneamente con el tinte sensible al Ca^{2+} Fluo-4 y la obtención de imágenes por escaneo de líneas confocales. En comparación con la WT, tanto los iPSC-CMs isogénicos derivados del paciente (CPVTp) como con genoma editado (CPVTe) tuvieron eventos de liberación espontánea de Ca^{2+} más frecuentes en unidades de liberación de Ca^{2+} individuales, conocidas como chispas de Ca^{2+} , y esto fue aún más exacerbado por el isoproterenol (ISO), un simpaticomimético beta (FIG. 1B). La función RYR2 se examinó registrando los transitorios de calcio. Al inicio del estudio, CPVTp y CPVTe habían aumentado dramáticamente en frecuencia después de la despolarización (FIG. 1C). Con la estimulación con isoproterenol, la frecuencia después de la despolarización permaneció notablemente elevada en CPVTp y CPVTe en comparación con WT.

Dado que las arritmias clínicas emergen del comportamiento colectivo de los

cardiomiocitos ensamblados en los tejidos, para modelar mejor las arritmias hereditarias, se integraron películas musculares delgadas (MTF), opto-genética, y mapeo óptico para producir las “opto-MTFs”, una plataforma que permite la evaluación simultánea de la conducción y contracción del miocardio (FIG. 2A).

Se usó un lentivirus para programar cardiomiocitos que expresen rodopsina del canal (ChR2), un canal controlado con luz, como se describe. En experimentos piloto, la expresión de ChR2 en los cardiomiocitos permitió a la regulación de ritmo óptica usar luz azul sin afectar de manera medible su actividad eléctrica (FIG. 21). Se sembraron cardiomiocitos que expresaban ChR2 sensibles a la luz en trozos de gelatina micro-moldeados (FIG. 22H), de modo que los mismos se ensamblaron con la característica de alineación paralela del miocardio nativo (FIGS. 2A-2B). La iluminación con luz LED azul (470 nm, pulsos de 10 mseg) dirigida a través de una fibra óptica iluminó una región de $\sim 0.79 \text{ mm}^2$, que contenía ~ 500 células, en un extremo de las MTF de $3 \times 10 \text{ mm}$. Esto fue suficiente para provocar ondas de potenciales de acción que condujeron las MTFs por el eje largo de las fibras musculares (FIG. 2A). Al alcanzar dos voladizos de película ubicados en el otro extremo de la MTF, las ondas de potencial de acción indujeron la contracción de las iPSC-CM, desplazando el voladizo (FIGS. 2A y 2C). Usando mapeo óptico fluorescente con el colorante X-Rhod-1 sensible al Ca^{2+} en combinación con microscopía de campo oscuro, se registraron simultáneamente transitorios y la contracción de calcio. La propagación de la onda de calcio seguida de la desviación de los voladizos se observó claramente en las MTFs ensambladas utilizando los iPSC-CMs de control, lo que demuestra un acoplamiento efectivo de excitación-contracción (FIGS. 2C y 24). Las características espacio-temporales de las MTF, tales como el mapeo de activación, duración transitoria del calcio y velocidad de conducción se midieron a partir de los datos del mapeo óptico (FIG. 2D). Las MTFs adyacentes eran independientes entre sí, y el sistema de estimulación óptica permitió controlar por separado cada MTF a diferentes frecuencias.

Una vez establecida la plataforma opto-MTF, la misma se utilizó para caracterizar las propiedades a escala tisular de los tejidos cardíacos modificados por ingeniería genética de CPVT. La duración transitoria de Ca^{2+} y la velocidad de conducción de las opto-MTFs de CPVT no diferían significativamente de los controles (FIGS. 2E-2G y 24A). Mientras que los iPSC-CMs de CPVT exhibieron frecuentes post-despolarizaciones incluso en la línea base

(FIG. 1C), el ensamblaje en tejido de opto-MTF abolió en gran medida esta actividad anómala (FIG. 2F). Las láminas de tejido de CPVT recapitulan mejor el fenotipo basal de los pacientes, que tenían pocas arritmias en ausencia de ejercicio o estrés emocional.

Los pacientes con CPVT desarrollan taquicardia ventricular durante el ejercicio o el estrés emocional. Para simular características clave de estas condiciones provocativas in vitro, las opto-MTFs se estimularon con una frecuencia de regulación de ritmo óptica creciente (1-3 Hz) o estimulación β -adrenérgica (ISO 0-10 μ M). Sorprendentemente, el tratamiento de la CPVT, pero no las opto-MTFs de control ya sea con regulación de ritmo o ISO indujeron un subconjunto para sostener el reingreso de la onda espiral, el equivalente a nivel de tejido de la taquicardia ventricular (FIGS. 3A-3C). La combinación del índice de regulación de ritmo alta e ISO evocó con mayor potencia el reingreso. Durante el reingreso, los voladizos de opto-MTFs emparejados se movieron de forma asíncrona (FIG. 3D), imitando la contracción cardíaca no coordinada que afecta el gasto cardíaco en la taquicardia ventricular clínica. Estos datos muestran que el ensamblaje de los iPSC-CMs de CPVT en modelos de opto-MTF son características clave de la enfermedad a nivel tisular. Además, los datos implican el reingreso como un mecanismo de arritmia en la CPVT.

La heterogeneidad de la excitabilidad del tejido aumenta la vulnerabilidad del tejido al reingreso. Para investigar los mecanismos celulares que hacen que los tejidos de CPVT sean vulnerables al reingreso, se analizaron los datos de mapeo óptico para determinar el efecto del índice de regulación de ritmo y el isoproterenol en la dispersión de la velocidad de conducción (CV) y la duración transitoria del Ca^{2+} (CaTD) a través del espacio y tiempo. Solo se usaron registros con captura 1:1 y sin reingreso para estos análisis. Al aumentar la regulación del ritmo y el ISO, los tejidos de CPVT desarrollaron una mayor dispersión espacial y temporal de CV y CaTD que los tejidos de control (FIG. 4A, 4B y 24). Estos datos sugieren que la mutación RYR2 aumenta la heterogeneidad de la excitabilidad del tejido, creando un sustrato vulnerable al desarrollo del reingreso.

Se analizaron los eventos que iniciaron el reingreso en el sustrato vulnerable de CPVT. Se identificaron tres registros que identificaron el inicio del reingreso (FIG. 4C). En cada caso, se produjo una post-despolarización (FIG. 4C, flecha) en el momento del inicio del rotor. La DAD no fue suficiente para desencadenar la despolarización regional, pero sí causó un bloqueo de conducción regional y una conducción de impulso unidireccional, lo que resultó

en la formación del rotor. Este papel de las DADs por debajo del umbral de iniciar el reingreso fue predicho por un estudio previo de modelado computacional.

Aunque se sabe bien que la estimulación con catecolaminas provoca arritmia en la CPVT, no se conocían los objetivos moleculares a través de los cuales la estimulación β -adrenérgica desenmascara el potencial arritmico latente de las mutaciones RYR2. La estimulación β -adrenérgica activa numerosas rutas de señalización, incluyendo la cinasa II dependiente de Ca^{2+} -calmodulina (CaMKII) y la proteína cinasa A (PKA). La inhibición de la PKA usando un péptido potente permeable a las células, no redujo significativamente la frecuencia de chispas de Ca^{2+} tanto en iPSC-CMs derivados de pacientes (CPVTp) como isogénicos modificados con ingeniería genética (CPVTe) (FIG. 5A). Por el contrario, la inhibición de CaMKII con péptido inhibidor de autocamtida (AIP) permeable a las células, un inhibidor de CaMKII altamente selectivo y potente redujo de manera potente la frecuencia de chispas de Ca^{2+} en los iPSC-CM de CPVT (FIGS. 5A y 25).

La CaMKII focaliza múltiples proteínas que afectan directa o indirectamente el manejo de Ca^{2+} . Un objetivo importante de CaMKII es la serina 2814 (S2814) en el propio RYR2 (FIG. 5B). La fosforilación de RYR2-S2814 mediante CaMKII mejora fuga de Ca^{2+} de RYR2 diastólica y es generalmente pro-aritmica. Para probar la hipótesis de que la fosforilación mediada por CaMKII de RYR2-S2814 es esencial para la expresión de mutaciones de CPVT, se usó la edición del genoma de Cas9 para reemplazar S2814 con alanina (S2814A; FIG. 26) en ambos alelos de RYR2, tanto en RYR2 de tipo natural como RYR2^{R4651I/+} de referencia. Estos alelos mutantes se denominan WT-S2814A y CPVTe-S2814A, respectivamente. El RYR2 también está fosforilado en S2808 por PKA, y en la edición paralela del genoma también se usó para generar las líneas mutantes homocigotas RYR2-S2808A análogas, denominadas WT-S2808A y CPVTe-S2808A (FIG. 26). De acuerdo con el efecto del péptido inhibidor de CaMKII, los iPSC-CMs de CPVTe-S2814A mostraron una frecuencia de chispas de Ca^{2+} menor a la de CPVTe y ya sea comparable con WT, ya sea al inicio del estudio o con estimulación con isoproterenol (FIGS. 5C, 5D y 26). Por el contrario, los iPSC-CM de CPVTe-S2808A tenían una frecuencia de chispas de Ca^{2+} similar en comparación con la CPVTe (FIGS. 5C y 5D), lo que es consistente con la falta de efecto de la inhibición farmacológica con PKA (FIG. 5A). Se obtuvieron resultados similares midiendo la frecuencia de las transiciones de Ca^{2+} interrumpidas por las post-despolarizaciones (FIGS.

5E y 5F). Estos datos indican que se requiere la fosforilación con CaMKII de RYR2-S2814 para desenmascarar el potencial pro-arritmico de la mutación CPVT R4651I.

Para modelar el efecto de la inhibición de CaMKII sobre el tejido de CPVT, las opto-MTFs de CPVTe u de control isogénico se trataron con el inhibidor AIP selectivo. En ambas opto-MTFs de CPVTp y CPVTe, el AIP atenuó la frecuencia de reingreso de ondas en espiral (datos no mostrados). A continuación, se fabricaron opto-MTFs de iPSC-CMs de CPVTe-S2814A, que no exhibieron liberación anómala de Ca^{2+} en los ensayos en islas de células. La regulación de ritmo rápida y el ISO no indujeron el reingreso en estos tejidos (FIGS. 6B-6D). La medición de dispersión de CV y CaTD en estos tejidos mostró que la abolición de la fosforilación de S2814 evitó los aumentos inducidos por regulación de ritmo e ISO en la heterogeneidad del tejido de CPVT (FIGS. 6D-6G). Estos datos muestran que prevenir la fosforilación de RYR2-S2814 es suficiente para bloquear el reingreso a nivel de tejido en la CPVT.

Se creó un modelo de tejido humano de CPVT y se usó para dilucidar la patogénesis molecular y celular de esta enfermedad. A nivel molecular, se requiere la fosforilación con CaMKII de RYR2-S2814 para la expresión completa del potencial arritmico de la mutación de CPVT R4651I. Este evento de fosforilación puede ser un objetivo terapéutico selectivo cardíaco para el tratamiento de la CPVT. A nivel de tejido, estos estudios indican que el reingreso es un mecanismo de arritmia importante en la CPVT. Con regulación de ritmo rápida y estimulación con ISO, las opto-MTF de CPVT desarrollaron una mayor heterogeneidad tisular, lo que resultó en un sustrato vulnerable al reingreso. En este sustrato vulnerable, las post-despolarizaciones por debajo del umbral causadas por la mutación de CPVT, inician el reingreso en onda espiral.

Ejemplo 2: El AIP inhibe la arritmia en un modelo murino de CPVT

Como se informó anteriormente en la presente, AIP inhibió selectivamente la CPVT en un modelo de opto-MTF que expresa la mutación R4561I. Para determinar la eficacia *in vivo*, se generó un vector adenoviral que codifica una Autocamtida del Péptido Inhibidor (AIP) de CaMKII vinculada a GFP. Este vector adenoviral se inyectó en ratones por vía intraperitoneal (FIG. 6H). Como se muestra en la FIG. 7, se observó la expresión AIP-GFP en tejidos cardíacos de murinos. Las micrografías de tejido cardíaco muestran la ubicación de la expresión de AIP-GFP. Alrededor del dieciséis por ciento de las células positivas a troponina

expresaron niveles bajos de GFP, mientras que la gran mayoría de las células positivas a troponina expresaron GFP a niveles más altos (FIG. 8, panel izquierdo). También se cuantificó la expresión de AIP en células positivas a troponina (FIG. 8, panel derecho). Con la mayoría de las células que expresan el AIP vinculado al GFP en un nivel medio o alto.

La expresión de AIP fue suficiente para inhibir la fosforilación por CaMKII en respuesta a la estimulación con isoproterenol (FIGS. 9 y 10). La estimulación con isoproterenol simula las características clave de la CPVT inducida por ejercicio. Los niveles de CaMKII fosforilado en lisado de corazón completo se redujeron en ratones estimulados con isoproterenol que habían sido inyectados con el vector adenoviral que expresa AIP, AAV9-GFP-AIP, en relación con el nivel de CaMKII fosforilada presente en los lisados de control derivados de ratones inyectados con un vector de control (FIGS. 9 y 10).

El papel de la fosforilación para activar el canal de rianodina cardíaca se exploró aún más generando una genosustitución R176Q en el canal de rianodina cardíaca (RYR2) (FIG. 11) y luego caracterizando la electrofisiología de los ratones que portaban la mutación R176Q (FIG. 12 y 13). Los electrocardiogramas (ECGs) basales de la cepa natural y ratones que tienen una mutación R176Q en el canal de rianodina cardíaca (RYR2) se muestran en la FIG. 14. Para imitar los efectos de la CPVT inducida por el ejercicio, se utilizó un protocolo de regulación de ritmo e isoproterenol o epinefrina. Curiosamente, los ratones que portaban la R176Q que fueron tratados con isoproterenol o epinefrina que portaban la mutación R176Q mostraron cambios en la frecuencia cardíaca y los intervalos QT basales en relación con los ratones de control de cepa natural (FIGS. 15 y 16). Los cambios en la arritmia basal y espontánea en ratones R176Q se muestran en las FIGS. 17A-17E. Se observó arritmia inducida en ratones R176Q (FIG. 18). Estas arritmias no se observaron en ratones R176Q que recibieron un vector viral que codificaba el AIP.

Los resultados descritos en la presente anteriormente se obtuvieron usando los siguientes métodos y materiales.

Aislamiento y reprogramación de células de fibroblastos humanos - Las biopsias de piel fresca de los pacientes se cortaron en pedazos pequeños (menos de 1 mm³) y se incubaron con colagenasa 1 (1 mg/ml en DMEM) a 37°C durante 8 horas. El tejido digerido de cada paciente se colocó en un plato de cultivo de tejido, se cubrió con un cubreobjetos de vidrio y se cultivó en DMEM que contenía FBS al 10%. Después de 7 días con cambios

diarios en los medios, se pasaron las excrecencias de fibroblastos en el plato de cultivo de tejidos y el cubreobjetos. Los fibroblastos se reprogramaron antes de la pasada 5 a través de la transfección episomal con constructos de expresión OCT4, SOX2, KLF4 y OCT4 usando los Kits Nucleofector™ para Fibroblastos Dérmicos Humanos (Lonza). Las iPSC se probaron para determinar la pluripotencia mediante qRT-PCR y la inmunotinción de genes de pluripotencia, cariotipo, y formación de teratoma *in vivo*.

Mantenimiento de iPSC humanas - Todas las líneas de iPSC en estudio se mantuvieron en medio mTeSR™1 (STEMCELL Technologies) y se pasaron en solución de verseno (15040066, Thermo Fisher Scientific) cada cinco días. Los platos de cultivo se revistieron con Matrigel diluido 1:100 (Matriz Calificada con hESC de Corning® Matrigel®, sin LDEV) antes del pase.

Diferenciación de cardiomiocitos (iPSC-CM) de iPSCs humanas - Se sembraron iPSC humanas en platos recubiertos con Matrigel en densidad de pase normal. La diferenciación de iPSC de los iPSCCMs siguió la línea de tiempo mostrada en la FIG. 20E. El día 3 del cultivo de iPSC, se retiró el medio mTeSR™1, las células se enjuagaron una vez con PBS (sin Ca^{2+} o Mg^{2+}) y se cultivaron en el Medio de Diferenciación (medio RPMI (11875093, Thermo Fisher Scientific) con B27 sin insulina (A1895601, Thermo Fisher Scientific)) que contiene CHIR99021 5 μM (72054, STEMCELL Technologies). Después de 24 horas, el medio se cambió a un medio de diferenciación sin CHIR99021. En el día 3 de la diferenciación, las células se cultivaron en el medio de diferenciación que contenía IWR-1 5 μM (3532, Tocris). Después de 48 horas, las células se cultivaron en medio de diferenciación sin IWR hasta el día 15, con cambios de medios cada 2-3 días. En el día 15, las células se cultivaron en Medio de Selección (DMEM Sin Glucosa (11966025, Thermo Fisher Scientific) con Lactato 0.4 mM (# L7022, Sigma Aldrich)) durante 5 días para enriquecer los iPSCCMs.

Aislamiento de cardiomiocitos diferenciados y Siembra en trozos modificados con ingeniería genética

Se aislaron cardiomiocitos humanos derivados de iPSCs incubando en colagenasa 1 (Sigma C-0130, 100 mg de colagenasa 1 en 50 ml de PBS/20% de FBS) durante 1 hora, seguido de una incubación en Tripsina al 0.25% a 37°C durante 5-10 minutos. Se usó 50% de FBS en DMEM con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNasa I (# 260913, EMD Millipore) para detener la tripsinización. Los iPSC-CMs se suspendieron en medio de cultivo (RPMI:DMEM Sin

Glucosa 1:1, más B27 1x sin insulina y Lactato 0.2 mM) que contenía FBS al 10% y Y27632 10 μ M. Los cardiomiocitos se suspendieron con medio de cultivo que contenía FBS al 10% y Y27632 10 μ M en concentración final como 1 millón de células por volumen de 600 μ l para el trozo modificado con ingeniería genética. Después de 48 horas, el medio se cambió a un medio de cultivo en el trozo (1:1 mezclado por medio de cultivo y medio de selección). Al mismo tiempo, los cardiomiocitos resembrados se infectaron con lentivirus CHR2 durante 24 horas para futuros experimentos.

Tinción con inmunofluorescencia - Se sembraron cardiomiocitos diferenciados en un plato de fondo de vidrio recubierto con Matrigel durante 5 días. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego se permeabilizaron con 5% de suero de burro más 0.02% de tritón X-100 a 4°C durante la noche. Los anticuerpos primarios se usaron como 1:200 en 4°C > 8 h. Oct4 (SANTA CRUZ, SC8628), SSEA4 (Millipore, MAB4304), Troponina Cardíaca I (Abcam, ab56357), ACTN2 (Abcam, ab56357), RYR2 (Abcam, ab2827). Las imágenes fueron tomadas con el microscopio confocal Olympus FV1000.

Obtención de imágenes de Ca^{2+} - Se sembraron cardiomiocitos diferenciados en un plato con fondo de vidrio recubierto con Matrigel durante 5 días. Cada 50 μ g de Fluo 4 (F14201, Thermo Fisher Scientific) se disolvió con 8 μ l de DMSO, luego se diluyó 1:1 con Pluronic® F-127 (Solución al 20% en DMSO) (P3000MP, Thermo Fisher Scientific). Los cardiomiocitos se trataron con 3 μ g/ml de Fluo 4 a 37°C durante media hora. Luego se lavó con medio de cultivo antes del registro de Ca^{2+} . Todo el registro fue registrado en el medio de cultivo. El registro fue escaneado con el microscopio confocal FV1000-Olympus en 10 ms/línea y 1000 líneas por registro. Se usaron KN93 10 μ M (SIGMA K1385) y DIHIDROCLORURO H89 10 μ M como Compuesto inhibidor de CAMKII y PKA, Péptido Inhibidor Relacionado con Autocamptida-2 0.025 μ M (SCP0001 SIGMA) y el Inhibidor 14-22 de PKA 1 μ M (476485, EMD Millipore) y se utilizaron como péptido inhibidor de CAMKII y PKA. Se utilizó isoproterenol en 1 μ M.

Edición del genoma mediada por CRISPR/Cas9 - Los procedimientos para la edición del genoma con CRISPR/Cas9 son conocidos en la técnica. En general, las iPSCs humanas PGP1 de cepa natural que contenían Cas9 inducible por doxiciolina. El ARN guía de expresión de plásmido y el oligonucleótido donador de 90 nucleótidos se transfectaron en las

células PGP1-Cas9 con los Kits Nucleofector™ para Células Madre Humanas (Lonza # VPH-5012) en el programa B-016. Los clones candidatos de la edición del genoma se amplificaron por PCR y se secuenciaron para verificar que se ha producido la mutación por sustitución. Los cebadores de secuenciación son como sigue:

5 Para el sitio R4651:

Cebador directo R4651: TTG TAA GTT TAC GTG GCA GGA (SEQ. ID. NO: 2);

Cebador inverso R4651: CGC GTG CAT ATG TGT GTG TA (SEQ. ID. NO: 3);

Para el sitio S2814:

S2814 cebador directo: ACACTATGTTTGGAAATTTGTGCCA (SEQ. ID. NO: 4);

10 S2814 cebador inverso: TGCTTTCCTGCATATATTTGGCA (SEQ. ID. NO: 5);

Para el sitio S2808:

S2808 cebador directo: GGGCTGGAGAATTGAAAGAAC (SEQ. ID. NO: 6);

S2808 cebador inverso: CCCTTCTAAATTTTGTGACTCTTCA (SEQ. ID. NO: 7).

15 Seleccionamos la mutación heterocigota en el sitio R4651 y la mutación homocigota en el sitio S2814 y S2808.

Las secuencias de ARN guía (ARNgs) utilizadas fueron:

Para el sitio 2808: CGTATTTCTCAGACAAGCCAGG (SEQ. ID. NO: 8)

Para el sitio 2814: CAAATGATCTAGGTTTCTGTGG (SEQ. ID. NO: 9)

Para el sitio 4651: GACAAATTTGTAAATAAAGG (SEQ. ID. NO: 10)

20 La plantilla de Reparación dirigida por homología (HDR) de 90 nucleótidos fue:

Para el sitio 2808:

CGGGAGGGAGACAGCATGGCCCTTTACAACCGGACTCGTCGTATTGCTCAGACAA
GCCAGGTAAGAATTCATCACGGTGATGAATCAACTG (SEQ. ID. NO: 11)

Para el sitio 2814:

25 AGGTTTTTAATGAGGCACTGTTTTTTCACACAAATGATCTAGGTTGCTGTGGACGC
TGCCCATGGTTACAGTCCCCGGGCCATTGACATGA (SEC. ID. NO: 12)

Para el sitio 4651:

ATTTTAGGTCATTTCCCAACAACACTACTGGGACAAATTTGTAAATAAAGGTAATA
TTACTTGGAATCCTCTACATTTTCTTAAAGCACA (SEQ. ID. NO: 13)

30 **Cultivo de iPSC-CMs comerciales** - Se cultivaron cardiomiocitos comerciales derivados de hiPSC (hiPSC-CMs, Cor4U; Axiogenesis, Colonia, Alemania) de acuerdo con las

instrucciones del fabricante. Brevemente, un matraz de cultivo de células T-25 (por cada 1 millón de crioviales) se revistió con 0.01 µg/ml de fibronectina (FN) (BD Biosciences, Bedford, MA) un día antes de la siembra celular. Los crioviales se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37°C y se re-suspendieron en 9 mL del medio de cultivo completo (Axiogenesis, Colonia, Alemania) suplementado con 4,5 µL de puromicina 10 mg/mL (Axiogenesis, Colonia, Alemania). Después de 24 horas, los medios de cultivo celular se reemplazaron con medios libres de puromicina (volumen total 10 ml). Después de 48 horas, las células se disociaron con tripsina-EDTA al 0,25% (Life Technologies) durante 10 minutos, y luego se lavaron y suspendieron en medios libres de puromicina. Las células re-suspendidas se usaron para sembrar cubreobjetos o trozos de opto-MTF.

Recolección de miocitos ventriculares de ratas neonatales - El aislamiento de miocitos ventriculares de ratas neonatales se realizó como se describió previamente en la técnica. Brevemente, se retiraron los ventrículos de cachorros de rata Sprague Dawley de 2 días de edad (Charles River Laboratories). El tejido fue picado manualmente. Para la primera digestión enzimática, el tejido se colocó en una solución de tripsina al 0.1% (Sigma Aldrich) a 4°C durante aproximadamente 12 horas. Para la segunda etapa de la digestión enzimática, la tripsina se reemplazó con una solución de colagenasa de tipo II al 0.1% (Sigma Aldrich). Después de cuatro iteraciones de las digestiones de la segunda etapa a 37°C, los miocitos ventriculares se aislaron adicionalmente de la solución celular disociada resultante centrifugando y haciendo pasar la solución re-suspendida a través de un filtro celular de 40 µm. La solución se colocó en placas previamente dos veces durante 45 minutos cada una a 37°C para eliminar los fibroblastos y las células endoteliales. Luego, creamos la solución de siembra re-suspendiendo los miocitos ventriculares resultantes en un medio celular M199 (Life Technologies) suplementado con 10% de FBS inactivado por calor (Life Technologies).

Fabricación del sustrato de película delgada muscular de gelatina (MTF)

Los cubreobjetos de vidrio (22 por 22 mm cuadrados) se limpiaron con etanol al 70% (Sigma) y luego se cubrieron con cinta de baja adhesividad (3M). Usando un sistema de grabado láser (Epilog Laser), la cinta se cortó para tener dos rectángulos en el centro, rodeados por cuatro trapecoides en los bordes exteriores. Los rectángulos internos de 3 mm por 10 mm y 7 mm por 10 mm son para el voladizo y la región base de las MTF, respectivamente.

Los cubreobjetos de vidrio se activaron selectivamente, de modo que la gelatina en la

región base de las MTFs se uniera firmemente a los cubreobjetos de vidrio, aunque la gelatina en la región en voladizo se pueda despegar fácilmente. En primer lugar, solo se quitó la cinta de la región base, mientras que las cintas en las regiones en voladizo y exteriores permanecieron protegiendo el vidrio de la siguiente activación. Los cubreobjetos se activaron con una solución de NaOH (Sigma) 0.1 M durante 5 minutos, una solución de APTES al 0.5% (Sigma) en etanol al 95% (Sigma) durante 5 minutos, seguido de una solución de glutaraldehído al 0.5% durante 30 minutos.

La cinta en la región en voladizo se retiró después del proceso de activación, pero las cintas en las regiones exteriores permanecieron en los cubreobjetos de vidrio. 20% p/v de gelatina (Sigma) y 8% p/v de MTG (Ajinomoto) se calentaron a 65°C y 37°C, respectivamente, durante 30 minutos. Luego, las soluciones se mezclaron para producir una solución final de 10% p/v de gelatina y 4% p/v de MTG. Se pipetearon rápidamente 300 µl de la mezcla de gelatina sobre las regiones rectangulares interiores expuestas de los cubreobjetos de vidrio. Los sellos PDMS con características de ranura de línea (25 µm de ancho de cresta, 4 µm de ancho de ranura y 5 µm de profundidad de ranura) se invirtieron luego en la parte superior de la gota de gelatina y se aplicó peso con un peso de 200 g. Se dejó recuperar la gelatina durante la noche a temperatura ambiente con el sello y el peso en su lugar.

Después de que la gelatina se recuperó, el peso se eliminó cuidadosamente junto con el exceso de gelatina en los lados del sello. Para minimizar el daño a la gelatina micro-moldeada, el cubreobjetos y el sello se sumergieron en agua destilada para rehidratar la gelatina durante una hora. El sello se despegó cuidadosamente de la gelatina.

Los cubreobjetos con la gelatina micro-moldeada se secaron rápidamente con toallitas de papel (Kimwipes, Kimberly-Clark Professional). Los voladizos (1 mm de ancho × 2 mm de largo) se grabaron con láser en la gelatina micro-moldeada deshidratada usando un sistema de grabado láser Epilog con 3% de potencia, 7% de velocidad y una frecuencia de 1900 Hz. Los trozos de gelatina se trataron con UVO durante 90 segundos y se rehidrataron en una solución MES 2 mM de pH 4.5 con colágeno 1 mg/ml y fibronectina 0.1 mg/mg. Los trozos de gelatina se almacenaron en solución a temperatura ambiente durante 2 horas. La solución de colágeno y fibronectina se reemplazó con PBS. Los trozos de gelatina se almacenaron a 4°C hasta la siembra celular.

Fabricación de sellos micro-moldeados con litografía blanda y PDMS - Los sellos micro-moldeados se fabricaron de polidimetilsiloxano (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning) utilizando los protocolos de litografía blanda publicados anteriormente que son conocidos en la técnica. Brevemente, la foto-resina SU-8 2005 de 5 μm de grosor (MicroChem) se revistió por rotación sobre láminas de silicio y se pre-horneó a 90°C como se sugiere en el manual del protocolo MicroChem. La capa SU-8 se expuso a luz UV bajo foto-mascaras personalizadas con características de línea (líneas oscuras de 25 μm de ancho y líneas claras de 4 μm de ancho). Después de la exposición, las láminas se hornearon posteriormente a 90°C, se desarrollaron con acetato de propilenglicol- éter de monometilo y se procesaron al silano con fluorosilano (United Chemical Technologies). El PDMS se mezcló a una proporción base de 10:1 respecto al agente de curado, se vertió sobre la lámina, se curó a 65°C durante 4 horas, se despegó cuidadosamente de la lámina y se cortó en sellos micro-moldeados.

Construcción de opto-MTF - El vector lentiviral ChR2 en el que el promotor de troponina T cardíaca dirige el ChR2-eYFP se construyó en base al plásmido FCK(1.3)GW con el promotor de troponina T cardíaca (cTnT), ChR2 y una marca fluorescente amarilla mejorada.

Antes de la siembra, los trozos de gelatina se lavaron con PBS y se incubaron con medios de siembra hiPSC-CM o NRVM. Los iPSC-CMs de WT, CPVTp y CPVTe disociados se suspendieron en medios de cultivo que contenían FBS al 10% y Y27632 10 μM a una concentración final de 1 millón de células por 600 μl . Después de 48 horas, los medios de cultivo se reemplazaron con Medio de Cultivo en Trozos (mezcla 1:1 del Medio de Cultivo y Medio de Selección). Al mismo tiempo, los iPSC-CMs se transdujeron con el lentivirus ChR2 a una multiplicidad de infección de 14-23 durante 24 horas. Se sembraron células comerciales de hiPSC-CMs (Cor4U; Axiogenesis, Colonia, Alemania) y NRVM en dispositivos a una densidad de 220 k/cm^2 y 110 k/cm^2 , respectivamente. Después de 24 horas, los NRVMs se trataron con el lentivirus ChR2 a una multiplicidad de infección de 14-23 durante 24 horas.

Tinción inmunofluorescente de tejidos cardíacos modificados con ingeniería genética en hidrogeles de gelatina micro-moldeados - Las opto-MTFs de iPSC-CM se lavaron con PBS a 37°C, se fijaron en PBS con paraformaldehído al 4% y Triton X-100 al 0.05% durante 12 minutos a 37°C, y se enjuagaron con PBS. Los tejidos se tiñeron con anticuerpo primario monoclonal de α -actinina anti-sarcomérica de ratón (Sigma) durante 1

hora a temperatura ambiente, y luego con un anticuerpo secundario contra IgG de ratón conjugado con Alexa-Fluor 546 (Life Technologies) y DAPI (Life Technologies). Las muestras se montaron en portaobjetos de vidrio con montaje anti-desvanecimiento ProLong Gold (Life Technologies). Las imágenes de la pila Z se obtuvieron usando un microscopio confocal (Zeiss LSM) equipado con un objetivo alpha Plan-Apochromat 100x/1.46 Oil DIC M27.

Transferencia de Western - Se utilizaron geles Invitrogen Bolt al 10% para analizar todas las muestras. Para las transferencias Western RYR2 y RYR2-P2814, la transferencia se realizó usando 75V durante 900 minutos. Otras transferencias Western fueron transferidas usando 80V durante 120 min. Los anticuerpos del anticuerpo utilizados para las transferencias Western fueron los siguientes: CaMKII-fosfo-T286 (Abcam, ab171095), CaMKII (Abcam, ab134041), RYR2-fosfo-S2814 (Badrilla A010-31AP) y Troponina T cardíaca (Abcam ab45932). Se usaron Estándares de Proteínas Pre-Teñidas HiMark (Life Technologies #LC5699) como marcadores de peso molecular.

Obtención de imágenes del Ca^{2+} de los grupos de células - Se sembraron iPSC-CMs en platos de fondo de vidrio recubiertos con Matrigel durante 5 días. Se disolvieron 50 μg de Fluo-4 (F14201, Thermo Fisher Scientific) en 8 μl de DMSO, luego se diluyeron 1:1 con Pluronic® F-127 (Solución al 20% en DMSO) (P3000MP, Thermo Fisher Scientific). Los iPSC-CMs se trataron con 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Fluo-4 a 37°C durante media hora. Luego, las muestras se lavaron con Medios de Cultivo antes de obtener imágenes del Ca^{2+} en un Olympus FV1000 usando el modo de exploración de líneas (10 ms/línea, 1000 líneas por grabado). La línea de exploración se colocó dentro de los iPSC-CMs individuales que pertenecían a grupos de 3-10 células. Se realizaron grabados de eventos de liberación espontánea de Ca^{2+} durante los períodos en que las células no exhibían transitorios espontáneos de Ca^{2+} , o durante los períodos de latido espontáneo. Se usaron 14-22 amidas del Péptido Inhibidor relacionado con Autocantida-2 miristolado 0.025 μM (SCP0001 Sigma) y el inhibidor de PKA 1 μM (476485, EMD Millipore) como péptidos inhibidores de CaMKII y PKA. Se utilizó isoproterenol a 1 μM .

Ajuste óptico de opto-MTF - Se modificó el macroscopio de lente en tándem (Scimedia) para la medición simultánea de imágenes y contractilidad de Ca^{2+} con estimulación opto-genética (FIG. 20). Para obtener imágenes de Ca^{2+} , el sistema estaba equipado con una

cámara de alta velocidad (MiCAM Ultima, Scimedia), un objetivo plano APO 1×, un colimador (Lumencor) y una lámpara de mercurio de 200 mV para iluminación de epifluorescencia (X-Cite exacte, Lumen Dynamics) Para las mediciones de contractilidad, se incorporaron al sistema una cámara sCMOS de alta resolución espacial (pco.edge, PCO AG) y una luz LED de campo oscuro de 880 nm (Advanced Illumination). El campo de visión del sistema para la obtención de imágenes Ca^{2+} y campo oscuro fue de 10 mm por 10 mm y 16 mm por 13 mm, respectivamente. Para la estimulación opto-genética, se usó una matriz LED de 8 canales (465/25 nm, Doric Lenses) para generar pulsos ópticos. Se suministraron pulsos de luz para regular el ritmo de las MTFs individuales a través de 8 fibras ópticas (400 μm de diámetro, NA 0.48, Doric Lenses) y 8 cánulas de mono-fibra óptica (extremo plano, 400 μm de diámetro, NA 0.48, Doric Lenses) montadas 500 μm por encima de los trozos de gelatina usando un manipulador de 3 ejes (Zaber, Canadá). Para evitar la superposición de la longitud de onda de la luz de excitación en los transitorios de Ca^{2+} y la iluminación de campo oscuro para las mediciones de contractilidad con la longitud de onda de excitación de ChR2, se utilizó un conjunto de filtros con longitudes de onda más largas que la longitud de onda de excitación de ChR2. Para la obtención de imágenes de Ca^{2+} , se utilizó un filtro de excitación con 580/14 nm, un espejo dicroico con un corte de 593 nm y un filtro de emisión con 641/75 nm (Semrock, Rochester, NY). Para la obtención de imágenes de campo oscuro, se agregó un espejo dicroico con un corte de 685 nm y un filtro de emisión de paso largo con un corte de 664 nm (Semrock, Rochester, NY) en la trayectoria de la luz para obtener imágenes de Ca^{2+} . Las fuentes de luz de la matriz LED se controlaron de forma independiente mediante señales analógicas que se sintetizaron con un módulo de salida analógica (NI 9264, National Instruments) mediante un software personalizado escrito en LabVIEW (National Instruments). Para el procesamiento posterior a la obtención de imágenes, estas señales analógicas se plasmaron utilizando una cámara de alta velocidad y una cámara sCMOS de alta resolución espacial simultáneamente, para utilizar las señales analógicas como referencia para alinear cuadros de ambos sistemas.

Adquisición de datos a nivel de tejido - En el día 3 posterior a la transducción, se incubaron tejidos modificados con opto-MTF con X-Rhod-12 μM (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 30 minutos a 37°C, se enjuagaron con medio de cultivo con al FBS 2% para eliminar el colorante no asociado específicamente, y se incubaron nuevamente durante 30 minutos para

completar la desesterificación del colorante. Antes de grabar los experimentos, el medio de cultivo se reemplazó con solución de Tyrode (CaCl_2 1.8 mM, glucosa 5 mM, Hepes 5 mM, MgCl_2 1 mM, KCl 5.4 mM, NaCl 135 mM, y 0.33 mM NaH_2PO_4 en agua desionizada, pH 7.4, a 37°C; Sigma). La muestra de tejido modificada en la solución de Tyrode se mantuvo a 37°C durante los experimentos utilizando una incubadora de platos de cultivo (Warner Instruments).

Los tejidos modificados para opto-MTF fueron estimulados con un pulso óptico de 10 ms en un rango de frecuencias de 0.7 a 3 Hz utilizando un programa LabVIEW personalizado (National Instruments). La estimulación del punto óptico se aplicó en un extremo del tejido de MTF usando una fuente de luz LED (465/25 nm, Doric Lenses). En cada grabación, se adquirieron simultáneamente imágenes de Ca^{2+} y de campo oscuro con 2000 cuadros y 400 cuadros a una velocidad de cuadro de 200 Hz y 100 Hz durante 10 s y 4 s, respectivamente.

Análisis de datos de las imágenes de calcio – El post-procesamiento de los datos en bruto de calcio se realizó con un software personalizado escrito en MATLAB (MathWorks). Se aplicó un filtro espacial de 3×3 píxeles para mejorar la relación señal-ruido. Primero, se calculó el tiempo de activación local de Ca^{2+} , $\text{Tact}_{\text{p,px}}$ y 80% del tiempo de repolarización, $\text{CaTD80}_{\text{p,px}}$ de cada píxel (px) y cada pulso (p) identificando el tiempo con la pendiente máxima ascendente y el tiempo desde el recorrido ascendente hasta el 80% de recuperación, respectivamente. Luego, la velocidad de propagación de calcio, $\text{CaS}_{\text{p,px}}$ de cada píxel y cada pulso se determinó calculando la tasa de cambio direccional x e y de $\text{Tact}_{\text{p,px}}$ en 21 píxeles (3 píxeles en la dirección transversal, x, y 7 píxeles en la dirección longitudinal de la onda, y). Para calcular las dispersiones espaciales de la velocidad de propagación de Ca^{2+} , $\text{CaS}_{\text{espat}}$ y 80% del tiempo de repolarización, $\text{CaTD80}_{\text{spat}}$, se promedió la $\text{CaS}_{\text{p,px}}$ y $\text{CaTD80}_{\text{p,px}}$ a través de múltiples pulsos consecutivos (3-20 pulsos) de cada píxel y se calculó el coeficiente de varianza de estos promedios temporales en un área de interés (500 a 1000 píxeles). Para calcular las dispersiones temporales de las velocidades de propagación de calcio, CaS_{temp} y 80% del tiempo de repolarización, $\text{CaTD80}_{\text{temp}}$, se promedió $\text{CaS}_{\text{p,px}}$ y $\text{CaTD80}_{\text{p,px}}$ en todas las áreas de interés de cada pulso y se calculó el coeficiente de variación de estos promedios espaciales en múltiples pulsos consecutivos. La velocidad de propagación global de Ca^{2+} , $\text{CaS}_{\text{global}}$ y el 80% del tiempo de repolarización, $\text{CaTD80}_{\text{global}}$, se calculó promediando $\text{CaS}_{\text{p,px}}$ y $\text{CaTD80}_{\text{p,px}}$ en múltiples pulsos consecutivos y áreas de píxeles de interés. Se definió que las regiones donde la velocidad de propagación local de Ca^{2+} era menor a 0.2 cm/s tenían un

bloqueo de conducción funcional. Además, se midió la longitud de onda global de Ca^{2+} , amplitud de la señal de Ca^{2+} , y nivel diastólico relativo de Ca^{2+} . La longitud de onda global de calcio se definió como la distancia recorrida por las ondas en la duración del período refractario de calcio y se calculó multiplicando la velocidad de propagación de calcio, $\text{CaS}_{\text{global}}$ y el 80% del tiempo de repolarización, $\text{CaTD80}_{\text{global}}$. La amplitud de calcio se calculó como la diferencia entre el nivel sistólico y diastólico máximo de Ca^{2+} . Los niveles diastólicos relativos de Ca^{2+} se calcularon a partir del valor diastólico medio en más de 500 puntos de muestreo distribuidos en todo el tejido restando la intensidad de fondo medida en 10 puntos fuera de la opto-MTF. Este valor sustraído del fondo a la velocidad base (0.7 Hz, sin ISO) se estableció como F0. El cambio en el nivel diastólico relativo de Ca^{2+} a frecuencias de regulación de ritmo más altas se calculó como $(F-F_0)/F_0$. Para determinar el ISO y la dependencia de la frecuencia de la regulación de ritmo de las variables globales, los datos de las variables globales se normalizaron a valores de la misma opto-MTF a un ritmo de regulación de 1.5 Hz sin ISO.

Análisis de los datos de imágenes de campo oscuro de contractilidad - El procesamiento posterior de los datos de imágenes del campo oscuro se realizó utilizando un software personalizado escrito en MATLAB (MathWorks). El programa de software ImageJ de cuantificación de la tensión contráctil se modificó como se conoce en la técnica. Primero, la longitud proyectada de cada MTF de cada cuadro se midió usando las funciones MATLAB de umbral de imagen. Luego, la tensión de la película se calculó usando la longitud proyectada, el grosor de la película de gelatina y las propiedades de la gelatina considerando la relación geométrica del radio de curvatura, el ángulo del arco y la longitud proyectada de la película, usando una ecuación de Stoney modificada. Aquí, el módulo de Young = 56 kPa, y el grosor de la MTF en gelatina = 188 μm , como se determinó previamente en la técnica. La tensión de contracción se calculó como la diferencia entre las tensiones pico y basal.

Análisis estadístico - Las diferencias funcionales a nivel de tejido se calcularon con la prueba t de Student ($p < 0.05$) y se aplicó la corrección de pruebas múltiples de Benjamini-Hochberg con una tasa de descubrimientos falsos (FDR) del 20%.

Otras Modalidades

A partir de la descripción anterior, será evidente que pueden hacerse variaciones y modificaciones a la invención descrita en la presente para adoptar la misma a diversos usos y

condiciones. Tales modalidades también están dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

La recitación de un listado de elementos en cualquier definición de una variable en la presente incluye definiciones de esa variable como cualquier elemento único o combinación (o sub-combinación) de elementos listados. La recitación de una modalidad en la presente incluye esa modalidad como cualquier modalidad individual o en combinación con cualquier otra modalidad o partes de la misma.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en esta especificación se incorporan en la presente como referencia en la misma medida que si cada patente y publicación independiente se indicara específica e individualmente como incorporada por referencia.