

TERAPIA GÉNICA CARDÍACA CON AAV PARA CARDIOMIOPATÍA

MEMORIA DESCRIPTIVA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama el beneficio de las fechas de presentación de la solicitud provisional norteamericana N° 62/682.772 presentada el 8 de junio de 2018, y la solicitud provisional norteamericana N° 62/822.015 presentada el 21 de marzo de 2019, donde los contenidos completos de ambas se incorporan por referencia.

ANTECEDENTES

La cardiomiopatía dilatada (DCM, sigla en inglés de "Dilated Cardiomyopathy") es la segunda causa más común de enfermedad cardíaca en perros, y el manejo médico de los signos secundarios es la única opción terapéutica. El pronóstico para los perros afectados depende de la etapa de la enfermedad y la raza. Los dóbermans exhiben una progresión particularmente rápida y uniforme una vez que la insuficiencia cardíaca congestiva (CHF, sigla en inglés de "Congestive Heart Failure") se ha producido, y la mayoría vive menos de 6 meses. La cardiomiopatía dilatada (DCM) es el tipo más común de cardiomiopatía humana, ocurriendo mayormente en adultos de 20 a 60. Afecta los ventrículos y atrios del corazón, las cámaras inferiores y superiores del corazón, respectivamente. La mayoría de las formas de DCM son formas adquiridas de un número de causas que incluyen enfermedad cardíaca coronaria, ataque cardíaco, presión sanguínea alta, diabetes, enfermedad tiroídea, hepatitis viral e infecciones virales que inflaman el músculo cardíaco. El abuso del alcohol y ciertos fármacos, tales como cocaína y anfetaminas, al igual que al menos dos fármacos usados para tratar cáncer (doxorubicina y daunorrubicina), también pueden llevar a DCM. Además, hay un número de formas genéticas de DCM, incluyendo pero no limitadas a las DCM asociadas con distrofias musculares de Duchenne y Becker. En el caso de ciertas formas de distrofia muscular de

Becker, al igual que en la mayoría de los casos de distrofia muscular de Duchenne, la cardiomiopatía puede limitar en última instancia la supervivencia del paciente.

RESUMEN

La cardiomiopatía es la segunda causa más común de enfermedad cardíaca en sujetos y el manejo médico de los signos secundarios es la única opción terapéutica. El pronóstico para los sujetos afectados depende de la etapa de la enfermedad y la raza. La función cardíaca es críticamente dependiente de la señalización dependiente del calcio. Durante la enfermedad cardíaca, el mal funcionamiento de los canales de calcio dentro de las células cardíacas promueve anormalidades en el ciclado del calcio, inhibiendo aún más la función cardíaca. Estrategias de transferencia de genes para reducir las anormalidades en el ciclado del calcio han demostrado mejorar la enfermedad cardíaca en modelos animales pequeños y grandes, al igual que en ensayos clínicos en humanos.

En humanos, la cardiomiopatía dilatada es el tipo más común de cardiomiopatía y puede originarse de un número de condiciones adquiridas y también genéticas. Como en los perros y en otros modelos animales, a pesar de que los orígenes de la enfermedad proceden de la disfunción en el manejo del calcio, la progresión definitiva de la enfermedad es impulsada por disfunción mitocondrial y/o apoptosis inducida por estiramiento de los cardiomiocitos. A pesar de que abordar solo el manejo del calcio puede ser eficaz en etapas tempranas de la enfermedad, abordar la combinación de manejo del calcio, disfunción mitocondrial y apoptosis será necesario para tratar todas las formas de DCM y en todas las etapas de progresión de la enfermedad.

Se divulgan aquí propuestas de administración de genes para el tratamiento de sujetos con cardiomiopatía e insuficiencia cardíaca congestiva. Estas propuestas comprenden la expresión de S100A1 para abordar el manejo del calcio y la expresión de ARC (represor de la apoptosis con dominio de reclutamiento de caspasas) para bloquear todas las fuentes de apoptosis y normalizar la función mitocondrial. La expresión de los transgenes S100A1 y ARC mediante la propuesta del vector de AAV autocomplementario

divulgado, es rápida (o sea, dentro de horas), lo que es crítico para contrarrestar los efectos de la insuficiencia cardíaca en etapa terminal, y restringida al corazón. Así, estas propuestas abordan los tres impulsores de la aparición y progresión de DCM, y por lo tanto deberían ser aplicables a cualquier forma de DCM en cualquier etapa de progresión de la enfermedad.

Algunos aspectos de la presente divulgación proporcionan vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) para administrar transgenes al corazón de un sujeto. En algunas modalidades, estos vectores de rAAV incluyen al menos dos transgenes, uno que codifica una proteína de la familia S100 y uno que codifica un inhibidor apoptótico. Estos vectores de rAAV pueden incluir, de 5' a 3', en orden, una primera secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de un virus adenoasociado (AAV), un promotor enlazado operativamente a los transgenes, y una segunda secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV. En algunas modalidades, dos transgenes están enlazados operativamente al mismo promotor único. En otras modalidades, cada transgén está enlazado operativamente a un promotor separado. En algunas modalidades, el vector de rAAV también incluye al menos una señal de poliadenilación (por ejemplo, 3' con respecto a dos transgenes expresados de un promotor único, o 3' con respecto a uno o ambos transgenes expresados de diferentes promotores). Aspectos de la divulgación proporcionan un vector de ácido nucleico de un virus adenoasociado recombinante (rAAV) para administrar dos o más transgenes al corazón de un sujeto, en donde dicho vector comprende, de 5' a 3', en orden, una primera secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de un virus adenoasociado (AAV), dos o más transgenes y un promotor enlazado operativamente a los dos o más transgenes, una señal de poliadenilación y una segunda secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV, en donde los dos o más transgenes comprenden una proteína de la familia S100 y un inhibidor apoptótico.

Los transgenes de la presente divulgación pueden ser una proteína de la familia S100 y un inhibidor apoptótico. Por ejemplo, la proteína de la familia S100 es proteína A1 de unión a calcio S100 cardíaca (cS100A1) o una variante de la misma. En

otro ejemplo, el inhibidor apoptótico es represor de la apoptosis con dominio de reclutamiento de caspasas cardíaco (cARC) o una variante del mismo.

En algunas modalidades, uno o más de los transgenes de la presente divulgación son secuencias de origen natural. En algunas modalidades, uno o más transgenes son modificados por ingeniería genética para que tengan especificidad de especie. En algunas modalidades, uno o más transgenes tienen codones optimizados para expresión en una especie de interés, por ejemplo canina. En ciertas modalidades, uno o más transgenes (por ejemplo, el transgén cARC) tienen codones optimizados.

En algunas modalidades, un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) está presente entre los dos o más transgenes (por ejemplo, entre el transgén cS100A1 y el transgén cARC). En algunas modalidades, el transgén que codifica la proteína de la familia S100 es 5' con respecto al transgén que codifica el inhibidor apoptótico. En otras modalidades, el transgén que codifica el inhibidor apoptótico es 5' con respecto al transgén que codifica la proteína de la familia S100.

En algunas modalidades, el promotor es un promotor restringido al corazón. El promotor restringido al corazón puede ser un promotor de uno de los siguientes genes: gen de cadena pesada de α -miosina, gen de cadena pesada de 6-miosina, gen 2v de cadena liviana de miosina, gen 2a de cadena liviana de miosina, gen CARP, gen de α -actina cardíaca, gen de acetilcolina muscarínica m2 cardíaca, ANF, troponina C cardíaca, troponina I cardíaca, troponina T cardíaca (cTnT), gen de Ca-ATPasa del retículo sarcoplasmático cardíaco, α -actina esquelética; o un promotor cardíaco artificial derivado del gen MLC-2v. En algunas modalidades, el promotor restringido al corazón es un promotor de cTnT.

También se proporcionan aquí partículas de rAAV que contienen los vectores de rAAV divulgados aquí, encapsidados en cápsides de AAV. En algunas modalidades, la cápside de AAV comprende proteínas de la cápside derivadas de los serotipos AAV1, AAV2, AAV3, AAV6, AAV8 o AAV9. En algunas modalidades, la cápside de AAV comprende proteínas de la cápside derivadas del serotipo AAVrh.10.

Otros aspectos de la presente invención incluyen composiciones que contienen las partículas de rAAV descritas aquí. Estas composiciones pueden administrarse a un sujeto para terapia génica para enfermedad cardíaca. En algunas modalidades, la enfermedad cardíaca causa insuficiencia cardíaca en el sujeto. En algunas modalidades, la enfermedad cardíaca es cardiomiopatía. En otras modalidades, la enfermedad cardíaca es cardiomiopatía hipertrófica o cardiomiopatía dilatada. En otras modalidades, la enfermedad cardíaca es isquemia aguda.

Las composiciones de la presente invención pueden administrarse al sujeto por diferentes vías. En algunas modalidades, la composición se administra por inyección en el corazón del sujeto. En algunas modalidades, la administración de la composición resulta en la expresión de los transgenes en el corazón del sujeto.

En algunas modalidades, el sujeto es un mamífero. En algunas modalidades, el mamífero es un ser humano. En algunas modalidades, el mamífero es un animal de compañía. Por ejemplo, el animal de compañía puede ser un perro, gato, caballo, cerdo, vaca, oveja, conejo u otra mascota.

Cada uno de los elementos de la invención puede abarcar diversas modalidades de la invención. Por lo tanto, se anticipa que cada una de las limitaciones de la invención que involucra a algún elemento, o combinaciones de elementos, puede ser incluida en cada aspecto de la invención. Esta invención no está limitada en su aplicación a los detalles de construcción y la disposición de los componentes divulgados en la siguiente descripción o ilustrados en los dibujos. La presente invención puede tener otras modalidades y ser practicada o llevada a cabo de diversas maneras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La divulgación puede entenderse mejor por referencia a la siguiente descripción tomada en conjunto con

los dibujos que se acompañan, en los cuales números de referencia iguales identifican elementos iguales:

La **Figura 1** ilustra un diagrama de un ejemplo de construcción de AAV. Una primera repetición terminal invertida (ITR) de AAV va seguida por el promotor de troponina T cardíaca (cTnT), luego la secuencia con codones optimizados para la proteína A1 de unión a calcio S100 (cS100A1) con especificidad de especie, seguida por un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), seguido por la secuencia con codones optimizados para el represor de la apoptosis con dominio de reclutamiento de caspasas (cARC) con especificidad de especie, seguida por una secuencia de poliadenilación (PA) y una segunda ITR de AAV.

La **Figura 2** ilustra imágenes de MRI diastólicas de un perro con distrofia muscular tratada, al inicio y varias semanas después de la administración de genes. Los datos respaldan una remodelación cardíaca estable o ligeramente mejorada con una leve disminución del volumen ventricular izquierdo diastólico.

La **Figura 3** ilustra imágenes de MRI sistólicas de un perro con distrofia muscular tratada, al inicio y varias semanas después de la administración de genes. Los datos respaldan una función sistólica ventricular izquierda estable o ligeramente mejorada después del tratamiento, con una leve reducción en el volumen sistólico que sugiere una contractilidad mejorada y un aumento en el gasto cardíaco ventricular izquierdo.

La **Figura 4** presenta la fracción de eyección, deformación pico y gasto cardíaco de ratones D2.mdx después del tratamiento con AAVrh.10-S100A1/ARC. En un período de 24 semanas, los ratones inyectados con AAV terapéutico tuvieron fracciones de eyección, desarrollo de la deformación y gasto cardíaco mejor mantenidos en comparación con ratones inyectados con placebo.

La **Figura 5** presenta niveles de expresión de S100A1 y ARC en ratones tratados con vector de AAVrh.10-S100A1/ARC recombinante y ratones de control. El análisis de proteínas (inmunotransferencias "Western blot") confirmó que los niveles tanto

de S100A1 como de ARC eran elevados en los tejidos tratados en comparación con los controles (inyectados con placebo).

La **Figura 6** presenta cardiomiocitos de ratones de control y tratados bajo aumento de 10X y 20X. Los datos de histología cardíaca indican que los ratones tratados exhibían menos patología DMD en comparación con los corazones de control.

La **Figura 7** indica que el primero (de dos) perros con deficiencia de distrofina (perros GRMD), Calvin, mostró función cardíaca mejorada después del tratamiento con AAVrh.10-S100A1/ARC recombinante. Ambos perros inyectados exhibieron mejoras en fracción de eyección y otros parámetros cardíacos después del tratamiento, medidos por MRI cardíaca y confirmados por datos de ecocardiografía.

La **Figura 8** presenta datos de que el segundo perro GRMD, Sebastian, mostró función cardíaca mejorada después del tratamiento con AAVrh.10-S100A1/ARC.

Las **Figuras 9A a 9C** indican que el tratamiento con AAV-S100A1/ARC disminuyó los niveles séricos de creatina quinasa (CK) e impidió la atrofia muscular en los perros GRMD Sebastian y Calvin. Mediciones por MRI de masa muscular de las extremidades, medida por el área de ambas patas (Figura 9A), área de sección transversal (CSA) máxima (Figura 9B) y volumen de ambas patas (Figura 9C). Los resultados demuestran que la masa del músculo esquelético había aumentado o permanecido inalterada después del tratamiento cardíaco.

La **Figura 10** indica que los niveles circulantes de creatina quinasa (CK) en el músculo esquelético de los sujetos GRMD se redujeron después de la inyección de AAVrh.10-S100A1/ARC, indicando una reducción en el daño muscular en curso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere a composiciones y métodos de terapia génica cardíaca para enfermedades del corazón, por ejemplo cardiomiopatía, en un sujeto. Los métodos de la presente invención se refieren al uso de partículas de AAV recombinante (rAAV) para la administración y expresión concurrente de dos transgenes. Los transgenes

de la presente invención comprenden al menos dos clases de proteínas, donde cada una tiene una función específica para abordar diferentes aspectos de las enfermedades cardíacas. Una clase de transgenes regula la señalización del calcio en los cardiomiocitos, por ejemplo las proteínas de la familia S100. La otra clase de transgenes comprende represores de la apoptosis. En algunas modalidades, los transgenes pueden ser proteína A1 de unión a calcio S100 cardíaca (cS100A1) o una variante de la misma, y represor de la apoptosis con dominio de reclutamiento de caspasas cardíaco (cARC) o una variante del mismo.

Las composiciones y métodos de la presente invención se basan, al menos en parte, en los efectos sinérgicos de dos transgenes, por ejemplo S100A1 y ARC, cuando son administrados y expresados en forma concurrente en el corazón del sujeto. La proteína S100A1 mejora aspectos del manejo del calcio, incluyendo normalización de transitorios de calcio en el retículo sarcoplasmático, lo que lleva a la normalización de la función contráctil. La proteína ARC bloquea la apoptosis iniciada por mecanismos mitocondriales y no mitocondriales (tal como apoptosis inducida por estiramiento) y mejora la función mitocondrial. En otras palabras, S100A1 y ARC abordan dos componentes separados de la insuficiencia cardíaca (disfunción del manejo del calcio y apoptosis) con beneficios sinérgicos, llevando a mejores resultados terapéuticos a largo plazo. Además, las composiciones y métodos de la presente invención son eficaces en cualquier etapa de enfermedad de la insuficiencia cardíaca.

Además se proporcionan aquí métodos para fabricar partículas de rAAV adecuadas para administrar transgenes, por ejemplo S100A1 y ARC o una variante de los mismos, en el corazón del sujeto. Estas partículas de rAAV pueden comprender un genoma de AAV recombinante que comprende moléculas de ácido nucleico que codifican los transgenes, en donde dichas moléculas de ácido nucleico están encapsidadas por proteínas de la cápside de AAV. En algunas modalidades, las partículas de rAAV incluyen un vector de ácido nucleico de virus adenoasociado recombinante (rAAV). El genoma de AAV recombinante es un ADN de una sola hebra que puede comprender además elementos de la

secuencia que facilitan la integración del genoma de AAV en el genoma del huésped y la expresión de los transgenes. Por ejemplo, el genoma de AAV recombinante puede comprender promotores con especificidad de tejido para asegurar la expresión de los transgenes en tejidos u órganos blanco. Estas partículas de rAAV pueden usarse en una composición para el tratamiento de afecciones cardíacas.

Así, la presente divulgación proporciona además vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) para administrar transgenes al corazón de un sujeto. En algunas modalidades, los vectores de rAAV divulgados incluyen al menos dos transgenes, uno que codifica una proteína de la familia S100 y uno que codifica un inhibidor apoptótico. Estos vectores de rAAV pueden incluir, de 5' a 3', en orden, una primera secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de un virus adenoasociado (AAV), un promotor enlazado operativamente a los transgenes, y una segunda secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV. En algunas modalidades, dos transgenes están enlazados operativamente al mismo promotor único. En otras modalidades, cada transgén está enlazado operativamente a un promotor separado. En algunas modalidades, el vector de rAAV también incluye al menos una señal de poliadenilación (por ejemplo, 3' con respecto a dos transgenes expresados de un promotor único, o 3' con respecto a uno o ambos transgenes expresados de diferentes promotores).

La divulgación además proporciona un vector de ácido nucleico de un virus adenoasociado recombinante (rAAV) para administrar dos o más transgenes al corazón de un sujeto, en donde dicho vector comprende, de 5' a 3', en orden, una primera secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de un virus adenoasociado (AAV), dos o más transgenes y un promotor enlazado operativamente a los dos o más transgenes, una señal de poliadenilación y una segunda secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV, en donde los dos o más transgenes comprenden una proteína de la familia S100 y un inhibidor apoptótico.

Un "transgén", como se usa aquí, se refiere a un gen o material genético que ha sido transferido naturalmente, o por cualquiera de un número de técnicas de ingeniería

genética, de un organismo a otro. Un transgén puede ser una proteína o polipéptido de interés (por ejemplo, S100A1, ARC) o un ARN de interés (por ejemplo, un siARN o microARN). En algunas modalidades, un vector de rAAV puede comprender la secuencia de codificación para uno o más transgenes. Por ejemplo, un vector de rAAV puede comprender la secuencia de codificación para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 transgenes. En algunas modalidades, los vectores de rAAV de la presente divulgación comprenden la secuencia de codificación de ambos S100A1 y ARC o variantes de los mismos. En algunas modalidades, el vector de rAAV además comprende una región que codifica una proteína Rep. Los transgenes de la presente divulgación comprenden dos clases de proteínas, donde cada una tiene una función específica para abordar diferentes aspectos de una o más afecciones cardíacas. Una clase de transgenes puede regular la señalización del calcio en los cardiomiocitos, por ejemplo las proteínas de la familia S100. Otra clase de transgenes puede comprender represores de la apoptosis.

Como se usa aquí, el término "variante" se refiere a un ácido nucleico que tiene características que se desvían de lo que ocurre en la naturaleza, por ejemplo una "variante" es al menos alrededor de 70% idéntica, al menos alrededor de 80% idéntica, al menos alrededor de 90% idéntica, al menos alrededor de 95% idéntica, al menos alrededor de 96% idéntica, al menos alrededor de 97% idéntica, al menos alrededor de 98% idéntica, al menos alrededor de 99% idéntica, al menos alrededor de 99,5% idéntica, o al menos alrededor de 99,9% idéntica al ácido nucleico de tipo silvestre. Por ejemplo, una variante de transgén es un ácido nucleico que comprende una o más sustituciones en los nucleótidos de un transgén, en comparación con la secuencia de tipo silvestre del mismo. Estas sustituciones pueden ser silenciosas, o sea no modifican la secuencia de amino ácidos de ninguna proteína codificada (ni resultan de otra manera en una secuencia de amino ácidos variante). Alternativamente, estas sustituciones pueden resultar en modificaciones a la secuencia de amino ácidos de una proteína codificada, resultando en una proteína codificada que tiene una o más sustituciones de amino ácidos (por ejemplo, tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10-15 o 15-20 sustituciones de amino ácidos) con respecto a la secuencia

de la proteína de tipo silvestre. Estas sustituciones incluyen modificaciones químicas al igual que truncamientos. En algunas modalidades, una proteína que tiene una o más sustituciones de amino ácidos mantiene la función de la proteína de tipo silvestre, o mantiene sustancialmente la misma función (por ejemplo, al menos 25%, al menos 50%, al menos 75%, por ejemplo 50-75% o 75-100% de la función) que la función de la proteína de tipo silvestre. Este término además abarca fragmentos funcionales de una secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre.

En algunas modalidades, uno o más de los transgenes divulgados son secuencias de origen natural. En algunas modalidades, uno o más transgenes son modificados por ingeniería genética para que tengan especificidad de especie. En algunas modalidades, uno o más transgenes tienen codones optimizados para expresión en una especie de interés, por ejemplo, canina. En ciertas modalidades, el transgén cARC tiene codones optimizados.

Las proteínas de la familia S100 que pueden usarse de conformidad con la presente divulgación incluyen, sin limitación, S100A1, S100A2, S100A3, S100A4, S100A5, S100A6, S100A7 (por ejemplo, psoriasina), S100A8 (por ejemplo, calgranulina A), S100A9 (por ejemplo, calgranulina B), S100A10, S100A11, S100A12 (por ejemplo, calgranulina C), S100A13, S100A14, S100A15 (por ejemplo, koebnerisina), S100A16, S100B, S100P y S100Z, o variantes de las mismas.

En algunas modalidades, la proteína de la familia S100 puede ser proteína A1 de unión a calcio S100 (S100A1). En algunas modalidades, la S100A1 es S100A1 cardíaca (cS100A1) o una variante de la misma. La proteína cS100A1 es un regulador de la contractilidad miocárdica. Los niveles de proteína cS100A1 están reducidos en tejido hipertrofiado ventricular derecho en un modelo de hipertensión pulmonar. Además, S100A1 es un regulador del programa genético subyacente a la hipertrofia cardíaca, en que S100A1 inhibe la estimulación alfa1 adrenérgica de genes hipertróficos, incluyendo MYH7, ACTA1 y S100B. En los cardiomiocitos, S100A1 regula la red de SR controlada por calcio, la función sarcomérica y mitocondrial a través de modulación de la actividad de

RyR2, SERCA2, titina y F1-ATPasa mitocondrial. Como resultado, los cardiomiocitos y corazones con expresión aumentada de S100A1 exhiben desempeño sistólico y diastólico aumentado, un resultado de amplitudes transitorias mejoradas de Ca^{2+} que resultan de carga aumentada de Ca^{2+} en SR y posterior liberación sistólica de Ca^{2+} junto con filtración diastólica disminuida de Ca^{2+} en SR y resecuestro aumentado de Ca^{2+} . En forma concurrente, S100A1 aumenta la producción de fosfato de alta energía mitocondrial y así coordina el suministro de energía con la demanda aumentada de adenosin-5'-trifosfato (ATP) por el recambio aumentado de Ca^{2+} de los cardiomiocitos. La expresión reducida de S100A1 en los cardiomiocitos está asociada con función contráctil reducida, corroborando la importancia patofisiológica de esta proteína.

En algunas modalidades, la secuencia de ADNc (transgén) de S100A1 tiene 100% de identidad con una secuencia de S100A1 de origen natural. En otras modalidades, la secuencia de ADNc de S100A1 tiene al menos alrededor de 70% de identidad, al menos alrededor de 80% de identidad, al menos alrededor de 90% de identidad, al menos alrededor de 95% de identidad, al menos alrededor de 96% de identidad, al menos alrededor de 97% de identidad, al menos alrededor de 98% de identidad, al menos alrededor de 99% de identidad, al menos alrededor de 99,5% de identidad, o al menos alrededor de 99,9% de identidad con una secuencia de S100A1 de origen natural.

En algunas modalidades, la secuencia de ADNc de S100A1 es modificada por ingeniería genética para que tenga especificidad de especie. En modalidades particulares, la secuencia de ADNc de S100A1 tiene codones optimizados para expresión en una especie de interés. Ejemplos no limitantes de secuencias de ADNc de S100A1 se presentan más abajo.

S100A1 (*canis lupus familiaris*)

(Secuencia de referencia de NCBI: XM_005622816.2)

ATGGGCTCTGAGCTGGAGACAGCGATGGAGACTCTCATCAATGTGTTCCATGC
CCACTCGGGCAAGGAGGGAAACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTAAA

GGAGCTGCTGCAGACTGAGCTCTCCGGCTTCCTGGACGCCCAGAAGGATGCG
GATGCTGTGGACAAGGTGATGAAAGAGCTAGATGAGAATGGAGATGGGGAG
GTGGACTTCCAGGAGTATGTGGTGCTGGTGGCTGCCCTCACAGTGGCCTGTAA
CAACTTCTTCTGGGAAAACAGTTGA (SEQ ID NO: 1)

S100A1 (*felis catus*)

(Secuencia de referencia de NCBI: XM_003999773.3)

ATGGGCTCAGAGCTGGAGACGGCGATGGAGACTCTCATCAACGTGTTCCACG
CCCCTCGGGCAAGGAGGGAGACAAGTACAAGCTGAGCAAGAAGGAGCTAA
AAGAGCTGCTGCAGACCGAGCTCTCTGGCTTCCTGGACGCCCAGAAGGATGC
CGACGCTGTGGACAAGGTGATGAAAGAGCTAGACGAGAATGGAGATGGGGA
GGTGGACTTCCAAGAGTATGTGGTGCTGGTGGCTGCCCTCACAGTGGCCTGTA
ACAACTTTTTTCTGGGAGAACAGTTGA (SEQ ID NO: 2)

Algunos aspectos de la solicitud proporcionan composiciones y métodos que incluyen la administración de un transgén que codifica un inhibidor apoptótico (por ejemplo, un agente antiapoptótico). Ejemplos ilustrativos de inhibidores apoptóticos incluye fink, p35, crmA, Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, E1B-19K de adenovirus, y también antagonistas de agentes proapoptóticos (por ejemplo, antisentido, ribozimas, anticuerpos, etc.). En algunas modalidades, el inhibidor apoptótico es represor de la apoptosis con dominio de reclutamiento de caspasas (ARC). En otras modalidades, el inhibidor apoptótico es ARC cardíaco o una variante del mismo. En algunas modalidades, puede ser deseable administrar una proteína de la familia S100 y el inhibidor apoptótico por separado. En ciertas modalidades, un transgén que codifica la proteína de la familia S100 se administra concurrente o secuencialmente con uno o más inhibidores apoptóticos de molécula pequeña. Ejemplos de inhibidores apoptóticos de molécula pequeña incluyen inhibidores de c-Myc, inhibidores de Bax, inhibidores de p53, inhibidores de tBid, inhibidores de caspasas e inhibidores de miembros de la familia BCL-2 proapoptóticos. En

algunas modalidades, el represor de la apoptosis puede ser represor de la apoptosis con dominio de reclutamiento de caspasas cardíaco (cARC).

cARC es una proteína reguladora apoptótica expresada casi exclusivamente en células miogénicas. Contiene un dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) a través del cual bloquea la activación de algunas caspasas iniciadoras. ARC también bloquea eventos independientes de caspasas asociados con apoptosis. La apoptosis causada por isquemia aguda y remodelamiento ventricular subsiguiente está implicada como mediadora de la insuficiencia cardíaca. A pesar de que la insuficiencia cardíaca posisquémica puede tener múltiples causas, la atención reciente ha estado dirigida a entender la contribución de la apoptosis o muerte celular programada. La apoptosis se caracteriza por preservación de las membranas mitocondrial y del sarcolema, condensación de la cromatina nuclear y fagocitosis por macrófagos o células vecinas sin gatillar una respuesta inflamatoria. Se sabe que la activación de la apoptosis ocurre a través de mecanismos que involucran a las caspasas, una familia de cisteína proteasas que son sintetizadas como precursores inactivos y escindidas proteolíticamente a su forma activa. ARC es capaz de bloquear la activación de la apoptosis bloqueando las caspasas.

En algunas modalidades, la secuencia de ADNc (transgén) de cARC tiene identidad con una secuencia de cARC de origen natural. En otras modalidades, la secuencia de ADNc de cARC tiene al menos alrededor de 70% de identidad, al menos alrededor de 80% de identidad, al menos alrededor de 90% de identidad, al menos alrededor de 95% de identidad, al menos alrededor de 96% de identidad, al menos alrededor de 97% de identidad, al menos alrededor de 98% de identidad, al menos alrededor de 99% de identidad, al menos alrededor de 99,5% de identidad, o al menos alrededor de 99,9% de identidad con una secuencia de cARC de origen natural.

En algunas modalidades, la secuencia de ADNc de cARC es modificada por ingeniería genética para que tenga especificidad de especie. En modalidades particulares, la secuencia de ADNc de cARC tiene codones optimizados para expresión en una especie

de interés. En modalidades particulares, la secuencia de ADNc de cARC tiene codones optimizados para expresión en células caninas.

El transgén que codifica la proteína de la familia S100 (por ejemplo, una cS100A1) puede estar ubicado 5' con respecto al transgén que codifica el inhibidor apoptótico (por ejemplo, un cARC) dentro de los vectores de ácido nucleico de rAAV descritos. Alternativamente, el transgén que codifica el inhibidor apoptótico puede estar ubicado 5' con respecto al transgén que codifica la proteína de la familia S100 dentro de los vectores de ácido nucleico de rAAV descritos.

Ejemplos no limitantes de secuencias de ADNc de cARC se presentan a continuación.

ARC (*canis lupus familiaris*)

(Secuencia de referencia de NCBI: NM_001048121.1)

ATGCAGGAAGCGCCAGCCGCGCTGCCCACGGAGCCGGGCCCCAGCCCCGTGC
CTGCCTTCCTCGGCAAGCTGTGGGCGCTGGTGGGCGACCCGGGGACCGACCA
CCTCATCCGCTGGAGCCCGAGCGGGACCAGTTTCCTCGTCAGCGACCAGAGC
CGCTTCGCCAAGGAAGTGCTGCCCCAGTACTTCAAGCACAGCAACATGGCGA
GCTTCGTGCGGCAGCTCAACATGTACGGTTTTTCGGAAGGTGGTGAGCATCGA
GCAGGGCGGCCTGCTCAGGCCGGAGCGCGACACGTCGAGTTCCAGCACCCG
AGCTTCGTCCGCGGCCGAGAGCAACTCCTGGAGCGCGTGCGGGCGCAAGGTGC
CCGCGCTGCGCAGCGACGACGGCCGCTGGCGCCCCGAGGACCTGGGCCGGCT
GCTGGGCGAGGTGCAGGCTTTGCGGGGAGTGCAAGGAGATCACCGAGGCGCGG
CTGCGGGAGCTCAGGCAGCAGAACGAGATCTTATGGAGGGAGGTGGTGACTC
TGCGGCAGAGCCACGGTCAGCAGCATCGCGTCATTGGCAAGCTGATCCAGTG
CCTCTTTGGGCCACTTCAGACAGGGTCCAGCGGCGCAGGAGCTAAGAGAAAG
CTGTCTCTGATGCTGGATGAGGGGAGCTCATGCCAACACCGGCCAAATTCA
ACACCTGTCCTTTACCTGGTGCCCTCTTGCAGGATCCCTACTTTATCCAGTCGC
CCCTCCCAGAGACCACCTTGGGCCTCAGCAGCTCTCATAGGACCAGGGGCCCT

ATCATCTCTGACATCCATGAAGACTCTCCCTCCCCTGATGGGACCAGGCTTTC
TCCTTCCAGTGGTGGCAGGAGGGAGAAGGGCCTGGCACTGCTCAAAGAAGAG
CCGGCCAGCCCAGGGGGGGAAGGCGAGGCCGGGCTGGCCCTGGCCCCAAAC
GAGTGTGACTTCTGCGTGACAGCCCCCCCCCCCCACTGTCCGTGGCTGTGGTGCA
GGCCATCCTGGAAGGGAAGGGGAAGTTTCAGCCCCGAGGGGGCCCAGGAATGCC
CAACAGCCTGAACCAAGGGGTCCCAGGGAGGTACCTGACAGGGGGACTCTGG
GCCTGGACAGGGGGGGCACGAAGCCCAGAGAATCTGCTGCCTCCCATGCTGCT
TCGGGCCCCCCCCTGAAAGTGTGGAGCCTGCAGGGCCCCTGGATGTGCTGGGC
CCCAGCCATCAAGGGCGAGAATGGACCCTGATGGACTTGGACATGGAGCTGT
CCCTGATGCAGCCCTTGGGTCCAGAGAGGAGTGAGACTGAGCTGGCGGTCAA
GGGGTTAAATTCTCCGGGGCCAGGGAAGGACTCCACACTTGGGGCACCCTC
CTGCTCGATGTCCAAGCGGCTTTGGGAGGCCCAGCTCTCAGCCTTCCTGGAGC
TTTAACCATTTACAGCACCCCTGAGAGCCGAGCCAACTACCTAGGCCCCAGGG
GCCAATCCCTCCCCCTGA (SEQ ID NO: 3)

ARC (*felis catus*)

(Secuencia de referencia de NCBI: XM_006941587.2)

ATGGGCAATGCGCAGGAGCGGCCCTCAGAGACGATCGATCGCGAGCGGAAA
CGCCTAGTGGAGACGCTGCAGGACGACTCCGGGCTGCTGCTGGATGCACTGC
TGGCGCGCGGCGTGCTCACCGGGCCTGAGTATGAGGCGTTGGACGCGCTGCC
TGATGCCGAGCGCAGGGTGCGTCGCCTGCTGCTGCTGGTACAAAGCAAGGGC
GAGGCCGCCTGCCAGGAGCTGCTGCACTGCGCCCAGCGTACTACGCGCGCGC
CAGACCCGGCCTGGGACTGGCAGCACGTGGGCACTGGCTACCGGGAACGCAG
CTACGACTCTCCATGCCCTGGCCACTGGACGCCTGAGGCACCTGACTTGAGGA
CCGCTTGCCCCGAAACGCCCAGAGCTTCAGACTGCGACGAGGCTGGGGTTTC
AGGGGGCTCGGAGGCAGTATCCGGAACCCTCGAGGAACTCGATCCGGAAGTG
GAAGCTGAAGTCTCTGAAGGGGCTGAGCCAGAGCCAGAGCCAGAGCCCGACT
TTGAGGCGGGTGATGAGTCTGAAGATTCC (SEQ ID NO: 4)

Vectores de AAV recombinante (rAAV)

Algunos aspectos de la presente invención se refieren a vectores de AAV recombinante que pueden usarse para terapia génica para enfermedades cardíacas. Como se usa aquí, el término "vector" puede referirse a un vector de ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido o genoma viral recombinante), un genoma de AAV de tipo silvestre, o un virus que comprende un genoma viral.

El genoma de AAV de tipo silvestre es un ácido desoxirribonucleico de una sola hebra (ADN ss), con sentido ya sea positivo o negativo. El genoma comprende dos repeticiones terminales invertidas (ITRs), una en cada extremo de la hebra de ADN, y dos marcos de lectura abiertos (ORFs): rep y cap entre las ITRs. El ORF rep comprende cuatro genes traslapados que codifican proteínas Rep requeridas para el ciclo de vida del AAV. El ORF cap comprende genes traslapados que codifican proteínas de la cápside: VP1, VP2 y VP3, que interactúan juntas para formar la cápside viral. VP1, VP2 y VP3 son traducidas de una transcripción de ARNm, que puede ser cortada y empalmada ("spliced") de dos maneras diferentes. Puede extirparse un intrón ya sea más largo o más corto, resultando en la formación de dos isoformas de ARNm: una isoforma de ARNm de ~2,3 kb y una de ~2,6 kb de longitud. La cápside forma un ensamble supramolecular de aproximadamente 60 subunidades de proteína de la cápside individuales para dar un entramado icosaédrico T-1 no envuelto, capaz de proteger al genoma de AAV. Una cápside de AAV madura está compuesta de VP1, VP2 y VP3 (masas moleculares de aproximadamente 87, 73 y 62 kDa, respectivamente) en una relación de alrededor de 1:1:10.

Las partículas de AAV recombinante (rAAV) pueden comprender un vector de ácido nucleico recombinante (de aquí en adelante denominado "vector de rAAV"), que puede comprender como mínimo: (a) una o más regiones de ácido nucleico heterólogo que comprenden una secuencia que codifica un transgén; y (b) una o más regiones que comprenden secuencias que facilitan la integración de la región de ácido nucleico heterólogo (opcionalmente con las una o más regiones de ácido nucleico que comprenden

una secuencia que facilita la expresión) dentro del genoma del sujeto. En algunas modalidades, las secuencias que facilitan la integración de la región de ácido nucleico heterólogo (opcionalmente con las una o más regiones de ácido nucleico que comprenden una secuencia que facilita la expresión) dentro del genoma del sujeto, son secuencias de repetición terminal invertida (ITR) (por ejemplo, secuencias de ITR de tipo silvestre o secuencias de ITR modificadas por ingeniería genética) flanqueando las una o más regiones de ácido nucleico (por ejemplo, regiones de ácido nucleico heterólogo). Las secuencias de ITR pueden ser derivadas de cualquier serotipo de AAV (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) o pueden ser derivadas de más de un serotipo. En algunas modalidades, las secuencias de ITR son derivadas de los serotipos AAV2 o AAV6. En algunas modalidades, un primer serotipo proporcionado aquí no es un serotipo AAV2 ni AAV8. En algunas modalidades, las secuencias de ITR del primer serotipo son derivadas de AAV3, AAV5 o AAV6. En algunas modalidades, las secuencias de ITR son derivadas de AAV2, AAV3, AAV5 o AAV6. En algunas modalidades, las secuencias de ITR son del mismo serotipo que la cápside (por ejemplo, secuencias de ITR de AAV6 y cápside de AAV6, etc.). En algunas modalidades, las secuencias de ITR son derivadas del serotipo AAVrh.10.

Secuencias de ITR y plásmidos que contienen secuencias de ITR son conocidos en el arte y están disponibles en el comercio (véanse por ejemplo, productos y servicios disponibles de Vector Biolabs, Philadelphia, PA; Cellbiolabs, San Diego, CA; Agilent Technologies, Santa Clara, Ca; y Addgene, Cambridge, MA; y Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. Kessler PD, Podsakoff GM, Chen X, McQuiston SA, Colosi PC, Matelis LA, Kurtzman GJ, Byrne BJ. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov 26;93(24):14082-7; y Curtis A. Machida. *Methods in Molecular Medicine™. Viral Vectors for Gene Therapy Methods and Protocols*. 10.1385/1-59259-304-6:201 © Humana Press Inc. 2003. Chapter 10. Targeted Integration by Adeno-Associated Virus. Matthew D. Weitzman, Samuel M. Young Jr., Toni Cathomen and Richard Jude Samulski; patentes norteamericanas US números 5.139.941 y 5.962.313, todos los cuales se incorporan aquí por referencia). En

algunas modalidades, el rAAV comprende un esqueleto de plásmido pTR-UF-11, que es un plásmido que contiene ITRs de AAV2. Este plásmido está disponible en el comercio de la American Type Culture Collection (ATCC MBA-331).

En algunas modalidades, los vectores de rAAV de la presente invención comprenden tanto el transgén cS100A1 como el transgén ARC, para su administración y expresión concurrente en un sujeto. Así, en algunas modalidades, el vector de rAAV comprende una o más regiones que comprenden una secuencia que facilita la expresión del transgén (por ejemplo, el ácido nucleico heterólogo), por ejemplo, secuencias de control de la expresión enlazadas operativamente al ácido nucleico. Numerosas de estas secuencias son conocidas en el arte. Ejemplos no limitantes de secuencias de control de la expresión incluyen promotores, aisladores, silenciadores, elementos de respuesta, intrones, potenciadores, sitios de iniciación, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES), señales de terminación y señales de poli(A). Cualquier combinación de estas secuencias de control está contemplada aquí (por ejemplo, un promotor y una señal de poli(A)). En algunas modalidades, los vectores de rAAV comprenden un promotor que está enlazado operativamente a la secuencia de codificación de los transgenes y facilita la expresión de los transgenes.

Un "promotor", como se usa aquí, se refiere a una región de control de un ácido nucleico en la cual se controla la iniciación y velocidad de transcripción del resto de una secuencia de ácido nucleico. Un promotor impulsa la transcripción de la secuencia de ácido nucleico que regula, por lo tanto típicamente está ubicado en o cerca del sitio de inicio transcripcional de un gen. Un promotor puede tener, por ejemplo, una longitud de 100 a 1.000 nucleótidos. En algunas modalidades, un promotor está enlazado operativamente a un ácido nucleico o una secuencia de un ácido nucleico (secuencia de nucleótidos). Un promotor se considera que está "enlazado operativamente" a una secuencia de ácido nucleico que regula cuando el promotor está en una ubicación y orientación funcional correcta con respecto a la secuencia, de manera tal que el promotor regula (por ejemplo, para controlar ("impulsar") la iniciación transcripcional y/o expresión de) esa secuencia.

Los promotores que pueden usarse de conformidad con la presente invención pueden comprender cualquier promotor que pueda impulsar la expresión de los transgenes en el corazón del sujeto. En algunas modalidades, el promotor puede ser un promotor con especificidad de tejido. Un "promotor con especificidad de tejido", como se usa aquí, se refiere a promotores que sólo pueden funcionar en un tipo específico de tejido, por ejemplo, el corazón. Así, un "promotor con especificidad de tejido" no es capaz de impulsar la expresión de los transgenes en otros tipos de tejidos. En algunas modalidades, el promotor que puede usarse de conformidad con la presente invención es un promotor restringido al corazón. Por ejemplo, el promotor puede ser, sin limitación, un promotor de uno de los siguientes genes: gen de cadena pesada de α -miosina, gen de cadena pesada de 6-miosina, gen 2v de cadena liviana de miosina, gen 2a de cadena liviana de miosina, gen CARP, gen de α -actina cardíaca, gen de acetilcolina muscarínica m2 cardíaca, ANF, troponina C cardíaca, troponina I cardíaca, troponina T cardíaca (cTnT), gen de Ca-ATPasa del retículo sarcoplasmático cardíaco, α -actina esquelética; o un promotor cardíaco artificial derivado del gen MLC-2v.

En algunas modalidades de los vectores de rAAV divulgados, los dos o más transgenes son controlados operativamente por un promotor único. En otras modalidades, cada uno de los dos o más transgenes es controlado operativamente por un promotor distinto.

En algunas modalidades, los vectores de rAAV de la presente invención además comprenden un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). Un IRES es una secuencia de nucleótidos que permite la iniciación de la traducción en el medio de una secuencia de ARN mensajero (ARNm) como parte del proceso más grande de síntesis de proteínas. Habitualmente en eucariotas, la traducción puede iniciarse sólo en el extremo 5' de la molécula de ARNm, ya que se requiere el reconocimiento de cap en 5' para el ensamblaje del complejo de iniciación. En algunas modalidades, el IRES está ubicado entre los transgenes. En estas modalidades, las proteínas codificadas por diferentes transgenes son traducidas individualmente (o sea, versus traducidas como una proteína de fusión).

En algunas modalidades, los vectores de rAAV de la presente divulgación además comprenden una señal de poliadenilación (pA). Los ARNm eucariotas típicamente son transcritos como un ARNm precursor. El ARNm precursor es procesado para generar el ARNm maduro, incluyendo un proceso de poliadenilación. El proceso de poliadenilación comienza a medida que la transcripción de un gen termina. El segmento más cerca de 3' del ARNm precursor recién fabricado primero es escindido por un conjunto de proteínas. Después, estas proteínas sintetizan la cola de poli(A) en el extremo 3' del ARN. El sitio de escisión típicamente contiene la señal de poliadenilación, por ejemplo AAUAAA. La cola de poli(A) es importante para la exportación nuclear, traducción y estabilidad del ARNm.

En algunas modalidades, los vectores de rAAV de la presente invención comprenden al menos, en orden de 5' a 3', una primera secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de un virus adenoasociado (AAV), un promotor enlazado operativamente a un primer transgén, un IRES enlazado operativamente a un segundo transgén, una señal de poliadenilación y una segunda secuencia de repetición terminal invertida (ITR) de AAV.

En algunas modalidades, el rAAV es circular. En algunas modalidades, el vector de rAAV es lineal. En algunas modalidades, el vector de rAAV es de una sola hebra. En algunas modalidades, el vector de rAAV es de doble hebra. En algunas modalidades, el vector de rAAV es un vector de rAAV autocomplementario. Cualquier vector de rAAV descrito aquí puede estar encapsidado por una cápside viral, tal como una cápside de AAV6 o cualquier otro serotipo (por ejemplo, un serotipo que es del mismo serotipo que las secuencias de ITR).

Partículas de AAV recombinante (rAAV)

También se proporcionan aquí partículas de rAAV o preparaciones de rAAV que contienen estas partículas. Las partículas de rAAV comprenden una cápside viral y un vector de rAAV descrito aquí, que está encapsidado por la cápside viral. Los métodos para producir partículas de rAAV son conocidos en el arte y están disponibles en el comercio

(véase por ejemplo, Zolotukhin *et al.* Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods* 28 (2002) 158–167; y las publicaciones de solicitudes de patentes norteamericanas números US 2007/0015238 y US 2012/0322861, que se incorporan aquí por referencia; y plásmidos y kits disponibles de ATCC y Cell Biolabs, Inc.). Por ejemplo, un plásmido que contiene el vector de rAAV puede ser combinado con uno o más plásmidos ayudantes, por ejemplo que contienen un gen rep (por ejemplo, que codifica Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40) y un gen cap (que codifica VP1, VP2 y VP3, incluyendo una región de VP3 modificada como se describe aquí), y transfectado dentro de una línea celular productora de tal manera que la partícula de rAAV pueda ser empacada y posteriormente purificada.

Las partículas de rAAV o partículas dentro de una preparación de rAAV divulgada aquí pueden ser de cualquier serotipo de AAV, incluyendo cualquier derivado o pseudotipo (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 2/1, 2/5, 2/8, 2/9, 3/1, 3/5, 3/8 o 3/9). Como se usa aquí, el serotipo de una partícula de rAAV se refiere al serotipo de las proteínas de la cápside del virus recombinante. En algunas modalidades, la partícula de rAAV es rAAV6 o rAAV9. Ejemplos no limitantes de derivados y pseudotipos incluyen AAVrh.10, rAAV2/1, rAAV2/5, rAAV2/8, rAAV2/9, híbrido AAV2-AAV3, AAVhu.14, AAV3a/3b, AAVrh32.33, AAV-HSC15, AAV-HSC17, AAVhu.37, AAVrh.8, CHt-P6, AAV2.5, AAV6.2, AAV2i8, AAV-HSC15/17, AAVM41, AAV9.45, AAV6(Y445F/Y731F), AAV2.5T, AAV-HAE1/2, clon 32/83 de AAV, AAVShH10, AAV2 (Y->F), AAV8 (Y733F), AAV2.15, AAV2.4, AAVM41 y AAVr3.45. Estos serotipos y derivados/pseudotipos de AAV y los métodos para producir estos derivados/pseudotipos son conocidos en el arte (véase, por ejemplo, Mol Ther. 2012 Apr;20(4):699-708. doi: 10.1038/mt.2011.287. Epub 2012 Jan 24. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. Asokan A1, Schaffer DV, Samulski RJ.). En algunas modalidades, la partícula de rAAV es una partícula de rAAV pseudotipada, que comprende (a) un vector de rAAV que comprende ITRs de un serotipo (por ejemplo, AAV2, AAV3) y (b) una cápside constituida por proteínas de la cápside derivadas de otro serotipo (por ejemplo, AAV1,

AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 o AAV10). Los métodos para producir y usar vectores de rAAV pseudotipados son conocidos en el arte (véase por ejemplo, Duan *et al.*, *J. Virol.*, 75:7662-7671, 2001; Halbert *et al.*, *J. Virol.*, 74:1524-1532, 2000; Zolotukhin *et al.*, *Methods*, 28:158-167, 2002; y Auricchio *et al.*, *Hum. Molec. Genet.*, 10:3075-3081, 2001).

Terapia génica con rAAV para enfermedades cardíacas

La presente invención también está dirigida a composiciones que comprenden una o más de las partículas o preparaciones de rAAV divulgadas. En algunas modalidades, la preparación de rAAV comprende una partícula de rAAV que comprende un vector de rAAV que contiene ITRs de un primer serotipo (por ejemplo AAV3, AAV5, AAV6 o AAV9) y proteínas de la cápside encapsidando al vector de rAAV. En algunas modalidades, las proteínas de la cápside son del primer serotipo (por ejemplo AAV3, AAV5, AAV6 o AAV9). En algunas modalidades, la preparación tiene una eficiencia de transducción al menos cuatro veces más alta (por ejemplo, en una línea celular de carcinoma hepatocelular humano, tal como Huh7) en comparación con una preparación preparada usando un vector de rAAV que contiene ITRs de AAV2.

Como se describe aquí, estas composiciones pueden comprender además un excipiente, tampón o diluyente farmacéutico, y pueden ser formuladas para administración a una célula huésped *ex vivo* o *in situ* en un animal, y particularmente un ser humano. Estas composiciones pueden comprender además opcionalmente un liposoma, un lípido, un complejo lipídico, una microesfera, una micropartícula, una nanoesfera o una nanopartícula, o pueden ser formuladas de otra manera para administración a las células, tejidos, órganos o cuerpo de un sujeto que las necesita. Estas composiciones pueden ser formuladas para el uso en una variedad de terapias, por ejemplo en la mejora, prevención y/o tratamiento de afecciones tales como deficiencia de péptidos, deficiencia de polipéptidos, sobre-expresión de péptidos, sobre-expresión de polipéptidos, incluyendo por ejemplo afecciones que resultan en enfermedades o trastornos como se describe aquí.

Los vectores de rAAV, las partículas de rAAV o la composición que comprende las partículas de rAAV de la presente divulgación, pueden usarse para terapia génica para enfermedades cardíacas en un sujeto que la necesita. Ejemplos de enfermedades cardíacas que pueden tratarse usando los métodos y composiciones de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, cardiomiopatía e isquemia aguda. En algunas modalidades, la cardiomiopatía cardíaca es cardiomiopatía hipertrófica o cardiomiopatía dilatada. La insuficiencia cardíaca causada por cardiomiopatía u otras enfermedades cardíacas comprende dos componentes, disfunción del manejo del calcio y apoptosis. Los vectores de rAAV, las partículas y las composiciones que comprenden las partículas de rAAV pueden usarse para el tratamiento de estas insuficiencias cardíacas cuando se administran a un sujeto que las necesita, por ejemplo, mediante inyección directa al corazón. Los vectores de rAAV, partículas y composiciones que comprenden las partículas de rAAV impulsan la expresión concurrente de la proteína cS100A1 y las proteínas ARC en los cardiomiocitos del sujeto. S100A1 mejorará aspectos del manejo del calcio, incluyendo normalización de los transitorios de calcio en el retículo sarcoplasmático que lleva a la normalización de la función contráctil. ARC bloqueará la apoptosis iniciada por mecanismos mitocondriales y no mitocondriales (tal como apoptosis inducida por estiramiento), y también mejorará la función mitocondrial. Así, los beneficios sinérgicos de las dos proteínas expresadas por los transgenes de la presente divulgación pueden llevar a mejores resultados terapéuticos a largo plazo al apuntar a ambos aspectos de la cardiomiopatía.

Así, otros aspectos de la presente invención se refieren a administrar a un sujeto que las necesita, las partículas de rAAV de la presente invención. En algunas modalidades, el número de partículas de rAAV administradas a un sujeto puede ser del orden en el rango de alrededor de 10^6 a alrededor de 10^{14} partículas/ml o de alrededor de 10^3 a alrededor de 10^{13} partículas/ml, o cualesquier valores entre ellos para ambos rangos, por ejemplo, alrededor de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} o 10^{14} partículas/ml. En algunas modalidades, el número de partículas de rAAV administradas a un sujeto puede ser

del orden en el rango de alrededor de 10^6 a alrededor de 10^{14} genomas de vector (vgs)/ml o de 10^3 a 10^{15} vgs/ml, o cualesquier valores entre ellos para ambos rangos, por ejemplo alrededor de 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} o 10^{14} vgs/ml. Las partículas de rAAV pueden administrarse como una dosis única, o divididas en dos o más administraciones como pueda requerirse para efectuar la terapia de la enfermedad o trastorno particular que está siendo tratado. En algunas modalidades, se administran al sujeto dosis en el rango de alrededor de 0,0001 ml a alrededor de 10 ml.

Si se desea, las partículas de rAAV y los vectores de rAAV pueden administrarse también en combinación con otros agentes, por ejemplo proteínas o polipéptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos, incluyendo una o más administraciones de polipéptidos terapéuticos, fragmentos biológicamente activos o variantes de los mismos. De hecho, virtualmente no hay límite a otros componentes que también pueden incluirse, siempre que los agentes adicionales no causen un efecto adverso significativo al entrar en contacto con las células blanco o tejidos huésped. Así, las partículas o preparaciones de rAAV pueden administrarse junto con diversos otros agentes farmacéuticamente aceptables, como se requiera en el caso particular. Estas composiciones pueden ser purificadas de células huésped u otras fuentes biológicas, o alternativamente pueden ser sintetizadas químicamente como se describe aquí.

Formulaciones que comprenden excipientes y/o soluciones de vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidas para los expertos en el arte, lo mismo que el desarrollo de la dosificación y regímenes de tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas aquí en una variedad de regímenes de tratamiento, incluyendo por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal, intra-articular e intramuscular.

Típicamente, estas formulaciones pueden contener al menos alrededor de 0,1% del agente terapéutico (por ejemplo, partícula o preparación de rAAV y/o vector de rAAV) o más, a pesar de que el porcentaje del o de los ingredientes activos, por supuesto, puede variar y puede ser convenientemente entre alrededor de 1 o 2% y alrededor de 70%

u 80% o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad del o de los agentes terapéuticos en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal manera que se obtenga una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Factores tales como solubilidad, biodisponibilidad, vida media biológica, vía de administración, vida en estantería del producto, al igual que otras consideraciones farmacológicas, serán contempladas por un experto en el arte al preparar estas formulaciones farmacéuticas. Adicionalmente, una variedad de dosificaciones y regímenes de tratamiento pueden ser deseables.

En ciertas circunstancias, será deseable administrar las partículas o preparaciones de rAAV y/o vectores de rAAV en composiciones farmacéuticas adecuadamente formuladas divulgadas aquí; ya sea por vía subcutánea, intracardiaca, intraocular, intravítrea, parenteral, subcutánea, intravenosa, intracerebro-ventricular, intramuscular, intratecal, oral, intraperitoneal, por inhalación oral o nasal, o por inyección directa a una o más células (por ejemplo, cardiomiocitos y/u otras células del corazón), tejidos u órganos. En algunas modalidades, las partículas de rAAV o la composición que comprende las partículas de rAAV de la presente invención se inyectan directamente en el corazón del sujeto. Inyección directa al corazón puede comprender inyección en uno o más de los tejidos miocárdicos, el revestimiento cardíaco, o el músculo esquelético que rodea al corazón, por ejemplo usando un catéter de aguja.

Las formulaciones farmacéuticas de las composiciones adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles. En algunas modalidades, la formulación es estéril y fluida hasta el punto en que sea fácil administrarla mediante jeringa. En algunas modalidades, la forma es estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento, y es preservada contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, suero fisiológico, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales u otros vehículos farmacéuticamente aceptables tales como aquellos que

son Generalmente Reconocidos Como Seguros (GRAS) por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE.UU. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante la mantención del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensoactivos.

El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el cual se administra la partícula o preparación de rAAV y/o los vectores de rAAV. Estos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de aceite de petróleo tal como aceite mineral, aceite vegetal tal como aceite de maní, aceite de soya y aceite de sésamo, aceite animal o aceite de origen sintético. Soluciones de suero fisiológico y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol también pueden emplearse como vehículos líquidos.

Para la administración de una solución acuosa inyectable, por ejemplo, la solución puede tamponarse adecuadamente si es necesario, y el diluyente líquido primero se hace isotónico con suficiente suero fisiológico o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, intravítrea, subcutánea e intraperitoneal. En conexión con esto, un medio acuoso estéril que puede emplearse será conocido para los expertos en el arte a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación puede ser disuelta en 1 ml de solución isotónica de NaCl y ya sea añadida a 1.000 ml de fluido de hipodermocclisis o inyectada en el sitio propuesto de infusión (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 y 1570-1580). Necesariamente ocurrirá alguna variación en la dosificación, dependiendo de la condición del sujeto que está siendo tratado. La persona responsable de la administración, en todo caso, determinará la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para administración a humanos, las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad y de seguridad general y pureza requeridos, por ejemplo, por la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando las partículas o preparaciones de rAAV, proteínas Rep y/o vectores de rAAV, en la cantidad requerida, en

el solvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados más arriba, como se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes de entre aquellos enumerados más arriba. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado al vacío y de secado por congelación, que proporcionan un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional proveniente de una solución previamente filtrada estéril de los mismos.

La cantidad de las composiciones de partículas o preparaciones de rAAV y/o vectores de rAAV y el tiempo de administración de estas composiciones, estarán dentro del alcance del experto en el arte con el beneficio de las presentes enseñanzas. Sin embargo, es probable que la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de las composiciones de la presente invención pueda efectuarse mediante una administración única, por ejemplo, una inyección única de números suficientes de partículas infecciosas para proporcionar un beneficio terapéutico al paciente sometido a este tratamiento. Alternativamente, en algunas circunstancias, puede ser deseable proporcionar administraciones múltiples o sucesivas de las composiciones de partículas o preparaciones de rAAV y/o vectores de rAAV, ya sea en un período de tiempo relativamente corto o relativamente prolongado, como puede ser determinado por el profesional médico que supervisa la administración de estas composiciones.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir partículas o preparaciones de rAAV y/o vectores de rAAV, ya sea por sí solos o en combinación con uno o más ingredientes activos adicionales que pueden obtenerse de fuentes naturales o recombinantes o pueden ser sintetizados químicamente. En algunas modalidades, partículas o preparaciones de rAAV son administradas en combinación, ya sea en la misma composición o administradas como parte del mismo régimen de tratamiento, con un inhibidor del proteasoma tal como Bortezomib, o hidroxiurea.

"Tratar" una enfermedad, como se usa aquí el término, significa reducir la frecuencia o gravedad de al menos un signo o síntoma de una enfermedad o trastorno experimentado por un sujeto. Las composiciones descritas más arriba se administran típicamente a un sujeto en una cantidad eficaz, que es una cantidad capaz de producir un resultado deseado. El resultado deseado dependerá del agente activo que está siendo administrado. Por ejemplo, una cantidad eficaz de una partícula de rAAV puede ser una cantidad de la partícula que es capaz de transferir un ácido nucleico heterólogo a un órgano, tejido o célula huésped.

La toxicidad y eficacia de las composiciones utilizadas en los métodos de la presente invención pueden determinarse por procedimientos farmacéuticos estándar, usando ya sea células en cultivo o animales experimentales para determinar la LD₅₀ (la dosis letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre toxicidad y eficacia es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀. Las composiciones que exhiben altos índices terapéuticos son preferidas. A pesar de que pueden usarse composiciones que exhiben efectos secundarios tóxicos, debe tenerse cuidado de diseñar un sistema de administración que minimice el daño potencial de esos efectos secundarios. La dosificación de las composiciones descritas aquí generalmente está dentro de un rango que incluye una ED₅₀ con poco o nada de toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada.

Otros aspectos de la presente invención se refieren a métodos y preparaciones para usar con un sujeto, tales como sujetos humanos o no humanos, una célula huésped *in situ* en un sujeto, o una célula huésped derivada de un sujeto. En algunas modalidades, el sujeto es un mamífero. En algunas modalidades, el sujeto es un animal de compañía. "Un animal de compañía", como se usa aquí, se refiere a mascotas y otros animales domésticos. Ejemplos no limitantes de animales de compañía incluyen perros y gatos; ganado tal como caballos, vacunos, cerdos, ovejas, cabras y pollos; y otros animales tales como ratones, ratas, cobayos y hámsters. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto humano.

En algunas modalidades, el sujeto tiene o se sospecha que tiene una enfermedad cardíaca que puede ser tratada con terapia génica. En algunas modalidades, el sujeto está en cualquier etapa de insuficiencia cardíaca. En algunas modalidades, la insuficiencia cardíaca es causada por cardiomiopatía. En algunas modalidades, la insuficiencia cardíaca es causada por cardiomiopatía hipertrófica o cardiomiopatía dilatada.

Los siguientes ejemplos están destinados a ser ilustrativos de ciertas modalidades de la presente invención y están destinados a ser no limitantes. Los contenidos completos de todas las referencias (incluyendo referencias de la literatura, patentes emitidas, solicitudes de patentes publicadas y solicitudes de patentes copendientes) citadas a través de esta solicitud, se incorporan aquí expresamente por referencia.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Direccionamiento terapéutico hacia múltiples aspectos de la insuficiencia cardíaca

En algunos aspectos, la presente invención proporciona composiciones y métodos que son útiles para tratar una o más afecciones cardíacas (por ejemplo, cardiomiopatía, cardiomiopatía hipertrófica, cardiomiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca, etc.). En algunas modalidades, las composiciones proporcionadas por la solicitud pueden suministrarse a un sujeto mediante múltiples inyecciones directas al corazón. Una construcción de AAV de ejemplo que podría suministrarse a un sujeto se ilustra en la Figura 1. En ciertas modalidades, esta construcción de ejemplo está encapsidada por un AAV recombinante (por ejemplo, AAV6) y comprende secuencias de codificación con especificidad de especie de proteína A1 de unión a calcio S100 (S100A1) y represor de la apoptosis con dominio de reclutamiento de caspasas (ARC) para abordar dos aspectos separados de una o más afecciones cardíacas (por ejemplo, cardiomiopatía). Ambos transgenes de la construcción de ejemplo de la Figura 1 son impulsados por el promotor TnT cardíaco y por lo tanto sólo se expresarán en cardiomiocitos.

S100A1 mejorará aspectos del manejo del calcio, incluyendo normalización de los transitorios de calcio en el retículo sarcoplasmático que lleva a normalización de la función contráctil. ARC bloqueará la apoptosis iniciada por mecanismos mitocondriales y no mitocondriales (por ejemplo, apoptosis inducida por estiramiento) y también mejorará la función mitocondrial. Estos dos componentes separados de la insuficiencia cardíaca (disfunción del manejo del calcio y apoptosis) se abordan por separado, pero nunca juntos. Así, los beneficios sinérgicos de esta propuesta proporcionan opciones terapéuticas que pueden dar lugar a resultados mejorados a largo plazo. Al ser direccionadas hacia ambos aspectos de la cardiomiopatía, las composiciones y métodos proporcionados por la presente solicitud pueden usarse para tratar múltiples afecciones cardíacas (por ejemplo, cardiomiopatía hipertrófica o dilatada), y serán beneficiosos en cualquier etapa de la insuficiencia cardíaca.

Todas las publicaciones, patentes y entradas de bases de datos de secuencias mencionadas en esta memoria se incorporan aquí por referencia en su totalidad, como si cada publicación o patente individual estuviera específica e individualmente indicada como que se incorpora por referencia. En caso de conflicto, la presente solicitud, incluyendo cualesquier definiciones, mandará.

Ejemplo 2: Terapia génica para cardiomiopatía dilatada en perros

La cardiomiopatía dilatada (DCM) es la segunda causa más común de enfermedad cardíaca adquirida en perros, afectando más comúnmente a perros de raza grande tales como dóberman, gran danés y lobero irlandés. En humanos afectados con esta enfermedad, hay opciones quirúrgicas tal como trasplante cardíaco y dispositivos de asistencia ventricular izquierda. Sin embargo en medicina veterinaria, la única opción terapéutica es el manejo médico de signos asociados con la insuficiencia cardíaca. El pronóstico para un perro afectado depende de la etapa de la enfermedad y la raza. Por ejemplo, la mayoría de los dóberman viven menos de 6 meses después del desarrollo de la insuficiencia cardíaca congestiva (CHF). En contraste, otras razas tal como cocker spaniel

tienden a sobrevivir más tiempo. A medida que la enfermedad cardíaca avanza, el mal funcionamiento de los canales que regulan el movimiento del calcio dentro de las células cardíacas promueve anormalidades en el ciclado del calcio, desregulando aún más la contracción y relajación del corazón. Especialmente, anormalidades en el transporte del calcio han sido reconocidas en perros con DCM⁵ de origen natural y también ocurren con insuficiencia cardíaca secundaria a muchas etiologías diferentes.

Estrategias de transferencia de genes diseñadas para normalizar anormalidades en el ciclado del calcio, mejoran la enfermedad cardíaca en modelos animales pequeños y grandes con diversas formas de enfermedad cardíaca. De hecho, ya están en curso ensayos clínicos en humanos para probar esta propuesta terapéutica para cardiomiopatía y los resultados preliminares son alentadores. Un estudio piloto está evaluando la eficacia de la administración de genes destinada a normalizar el manejo del calcio en dóbermans afectados con DCM y que exhiben CHF. Se utilizan dóbermans porque la DCM está muy extendida en esta raza y la enfermedad tiende a avanzar rápida y uniformemente en esta raza una vez que se ha desarrollado la CHF. Modalidades novedosas para abordar la DCM tendrán un impacto significativo en todas las razas caninas predispuestas a esta enfermedad idiopática, incluyendo dóberman, bóxer, gran danés, pastor alemán, cobrador dorado ("golden retriever"), etc. Especialmente, investigaciones previas en niveles de proteínas miocárdicas en muestras provenientes de perros con las formas más comunes de enfermedad cardíaca de origen natural (enfermedad valvular degenerativa canina y DCM), encontraron que los niveles de múltiples proteínas (incluyendo S100A1) eran anormales (S100A1 estaba disminuida).

Estos hallazgos sugieren que la administración de genes direccionada hacia S100A1 puede tratar eficazmente la DCM al igual que la insuficiencia miocárdica que se desarrolla secundaria a la enfermedad valvular degenerativa. Adicionalmente, la apoptosis (muerte celular programada) es más común en un miocardio enfermo y ARC es un inhibidor de la apoptosis potente y multifuncional. Actualmente, el tratamiento estándar para insuficiencia cardíaca veterinaria es el manejo médico de la sobrecarga de fluido y

congestión. Técnicas de administración de genes dirigidas a moléculas reguladoras miocárdicas anormales ofrecen un blanco mecanicista que puede permitir al profesional clínico veterinario abordar específicamente el proceso de enfermedad miocárdica por primera vez. Más aún, el costo asociado con las técnicas actuales de producción de vectores y la administración de genes intramiocárdica del vector hacen que el costo de esta terapia esté al alcance de muchos propietarios, esperándose que los costos disminuyan con el tiempo.

Un método mínimamente invasivo de transferencia de genes usando vectores de AAV 2/6 resultó en la transducción de >75% de las células miocárdicas en perros normales (véase Bish LT, Sleeper MM, Brainard B, *et al.* Percutaneous transendocardial delivery of self-complementary adeno-associated virus 6 achieves global cardiac gene transfer in canines. *Mol. Ther.* 16, 1953-9 (2008)). Seis perros mestizos normales fueron tratados ya sea con un vector de AAV2 o de AAV6 que codifica una forma negativa dominante de fosfolambán (dn-PLN) (una forma pseudofosforilada que compite con fosfolambán nativo, reduciendo por lo tanto su efecto inhibitor sobre SERCA2a) (n=4) o AAV2/6 dn-PLN y S100A1 (n=2). Todos los perros permanecieron sanos con función cardiovascular normal por 2 años después del tratamiento, lo que indica que la terapia no causó miocarditis ni alteró significativamente la función cardíaca, respaldando así la seguridad de esta propuesta terapéutica. De hecho, más de 40 perros normales y enfermos (véase más abajo) han sido inyectados, y los resultados hasta la fecha indican que la técnica de inyección es bien tolerada. Además, 20 casos caninos aleatorios en el hospital veterinario Matthew J. Ryan de la Universidad de Pensilvania fueron muestreados para determinar anticuerpos para rAAV2/6, y los títulos encontrados estuvieron dentro del rango aceptable para tratamiento en 19 de los 20 perros, lo que indica que respuestas inmunes previas no excluirán una proporción significativa de candidatos terapéuticos. Para determinar si esta propuesta terapéutica era eficaz para el tratamiento de DCM, después se trataron perros de agua portugueses con una forma grave de DCM juvenil de rápido avance. Particularmente, los perros inyectados con AAV2/6 dn-PLN exhibieron una disminución

marcada de PLN fosforilado, respaldando la capacidad potencial de esta propuesta para normalizar el ciclado del calcio en este modelo de enfermedad. Además, la administración de genes con un vector que contenía ambos dn-PLN y S100A1 retrasó el desarrollo de CHF secundaria a DCM en mayor grado que la administración de un vector que contenía dn-PLN solo. El vector de combinación retrasó la aparición de CHF por un promedio de 4 semanas en comparación con la terapia con dn-PLN solo. Por esta razón, la propuesta del vector combinado se utiliza en un estudio piloto para determinar si la terapia génica es eficaz para prolongar la vida de dóbermans afectados con DCM de aparición en edad adulta e insuficiencia cardíaca congestiva.

El estudio tiene un diseño ciego controlado por placebo. En base a los últimos 12 casos de DCM y CHF en dóbermans que han sido tratados, hubo una supervivencia media de 148 días (desviación estándar de 160 días). Usando una potencia de 0,8, alfa (bilateral) de 0,05 y una razón de casos a controles de 1, se requiere un tamaño de muestra de 13 perros en cada grupo para detectar una diferencia en la supervivencia a 6 meses. Este cálculo se determinó usando una prueba paramétrica de tamaño de la muestra. Se incorporan en el estudio veintiséis dóbermans con DCM y CHF controlada. Para ser apto para su incorporación, el perro debe tener un título de anticuerpos neutralizantes para AAV2/6 circulantes de menos de 1:20 y estar libre de enfermedad extracardíaca. Adicionalmente, los perros con enfermedad cardíaca congénita concomitante o evidencia de enfermedad valvular mitral primaria están excluidos. Al inicio (momento de la incorporación), un título de anticuerpos, CBC y panel de química sanguínea se usan para propósitos de sondeo. Los perros se someten a un electrocardiograma (ECG) de 3 minutos y a un ecocardiograma (ECHO) completo, y los propietarios completan un cuestionario de calidad de vida previamente validado. El ECG se evalúa en cuanto a duración de los intervalos y la presencia de arritmias. El ECHO incluye estudios de 2D, modo M y Doppler (incluyendo Doppler de tejidos). Radiografías torácicas se usan para estadificar la enfermedad (los perros están compensados clínicamente con una historia de insuficiencia cardíaca congestiva).

Los perros que cumplen con los requisitos para su incorporación son asignados aleatoriamente al brazo de placebo (inyección cardíaca con suero fisiológico) o al grupo con terapia génica (inyección cardíaca con AAV2/6-ARC-s100a1). El manejo médico estándar para DCM e insuficiencia cardíaca congestiva continúa durante todo el estudio en todos los perros (terapia con pimobendan, inhibidor de angiotensina y diurético). Suero fisiológico en lugar de cápside vacía se usa como terapia de placebo, de manera que los perros de control puedan ser sometidos a administración de genes si el grupo con tratamiento demuestra una mejora significativa en comparación con el grupo con placebo. A los 2, 4, 6, 9 y 12 meses después de la terapia, se repiten el ECG, ECHO, un cuestionario de calidad de vida y los análisis de laboratorio. El análisis estadístico se efectúa a intervalos bimensuales.

Las Figuras 2 y 3 presentan datos de diástole (relajación) y sístole (contracción), respectivamente, en un perro con distrofia muscular tratado. Los contornos del endocardio y el epicardio pueden verse en cada una de las figuras. Los datos indican función estable o ligeramente mejorada después del tratamiento por varias semanas, como se ve en la Tabla 1. La Tabla 1, más abajo, presenta los resultados de masa ventricular izquierda (LVM [g]), volumen diastólico final (EDV [ml]), volumen sistólico final (ESV [ml]), volumen sistólico (SV [ml]), fracción de eyección (EF [%]) y gasto cardíaco (CO [l/min]) para los datos tomados al tiempo 1 (pretratamiento) y tiempo 2 (postratamiento).

Tabla 1

Fecha de obtención	LVM[g]	EDV[ml]	ESV[ml]	SV[ml]	EF[%]	CO[l/min]
Tiempo 2	91,395035	54,22289	24,595001	29,627889	54,640926	3,940509
Tiempo 1	87,251524	57,471229	25,660014	31,811215	55,351548	3,117499

Ejemplo 3: Evaluación de fenotipos de distrofia después de la administración del vector a ratones y perros

La administración cardíaca de genes AAV del vector autocomplementario S100A1/ARC fue evaluada en modelos de ratón y perro de distrofia muscular (deficiencia de distrofina) de Duchenne. Anteriormente, los serotipos AAV8 (incluyendo múltiples variantes del mismo), AAV9 y AAVrh.10 fueron comparados en su capacidad para infectar corazones caninos, y se encontró que AAVrh.10 era el más eficiente. Por esta razón, se usó AAVrh.10 para todos los experimentos descritos en este Ejemplo.

Ratones Mdx (con deficiencia de distrofina) en el entorno DBA/2J ("D2.mdx") fueron inyectados a las 4 semanas de edad con vector AAVrh.10-S100A1/ARC recombinante (denominado más adelante como el "AAV terapéutico") y sacrificados 24 semanas más tarde. Los ratones D2.mdx resumen varias características humanas de la miopatía con distrofia muscular de Duchenne, tales como masa muscular reducida en las extremidades traseras inferiores, miofibras atrofiadas, fibrosis e inflamación aumentadas y debilidad muscular. Durante este período de 24 semanas, los ratones inyectados con el AAV terapéutico tuvieron fracciones de eyección, desarrollo de la deformación y gasto cardíaco mejor mantenidos en comparación con ratones inyectados con placebo (véase la Figura 4), medido por MRI cardíaca. El análisis de las proteínas (inmunotransferencias "Western blot") confirmó que los niveles de ambas S100A1 y ARC estaban elevados en los tejidos tratados en comparación con los controles (inyectados con placebo) (véase la Figura 5). Además, la histología cardíaca demostró que los corazones tratados mostraban mucha menos patología en comparación con los corazones de control (véase la Figura 6).

Dos perros GRMD (con deficiencia de distrofina) fueron inyectados con el vector terapéutico al momento de la primera disminución en sus fracciones de eyección cardíaca — un síntoma que indica la aparición de cardiomiopatía. Hallazgos anteriores de un estudio de historia natural de sujetos perros indicaron que, en cuanto las fracciones de eyección empiezan a bajar, continúan bajando progresivamente durante el año siguiente. Los perros típicamente no sobreviven más de 8-12 meses después de que la fracción de eyección comienza su disminución constante.

Como se ve en las Figuras 7 y 8, ambos sujetos mostraban mejoras en fracción de eyección y otros parámetros cardíacos varios meses después del tratamiento con AAVrh.10-S100A1/ARC, medido por MRI cardíaca y confirmado por mediciones de ECHO. Casi 12 meses después del tratamiento, el primer sujeto exhibió una fracción de eyección estable dentro del rango normal. Igualmente, casi 7 meses después del tratamiento, el segundo sujeto exhibió una fracción de eyección estable normal.

No sólo mejoró la función cardíaca, sino que también hubo una mejora constante en la capacidad de ejercicio de los perros, según se evaluó cualitativamente filmando a los sujetos durante el ejercicio. De conformidad con esta capacidad de ejercicio mejorada, las mediciones de MRI de las extremidades de los sujetos demostraron que la masa muscular esquelética estaba aumentada o bien inalterada después del tratamiento con AAV (Figuras 9A a 9C). Además, los niveles circulantes de creatina quinasa (CK) en el músculo esquelético se redujeron después del tratamiento (Figura 10), indicando una reducción en el daño muscular en curso.

Ejemplo 4: Tratamiento de sujetos perros adicionales

Dos sujetos dóberman han sido tratados con AAVrh.10-S100A1/ARC hasta la fecha, en donde ambos perros habían sufrido insuficiencia cardíaca al momento del tratamiento. El primer perro estaba cerca de la muerte al momento del tratamiento, exhibiendo una fracción de eyección cardíaca de sólo 10%. Dentro de 24 horas postratamiento, la fracción de eyección mejoró hasta 25% (datos no mostrados). En la primera visita de seguimiento del perro a los 4 meses postratamiento, la fracción de eyección se había mantenido estable en 26%. Este sujeto aún estaba vivo 5 meses después del tratamiento.

El segundo dóberman tratado tenía una fracción de eyección de 32% antes del tratamiento - una fracción que es baja, pero no en peligro inmediato de muerte. La fracción de eyección del perro mejoró hasta 49% dentro de 24 horas después del tratamiento (datos no mostrados), lo que está dentro del rango normal. Se informó que el segundo perro

estaba bien 5 semanas después del tratamiento. Este sujeto tuvo una primera visita de seguimiento 4 meses después del tratamiento.

En base a estos hallazgos preliminares, el tratamiento con AAVrh.10-S100A1/ARC es capaz de restablecer la función cardíaca en caninos hasta el rango normal.

EQUIVALENTES

A pesar de que varias modalidades inventivas han sido descritas e ilustradas aquí, los expertos en el arte visualizarán fácilmente una variedad de otros medios y/o estructuras para llevar a cabo la función y/u obtener los resultados y/o una o más de las ventajas descritas aquí, y cada una de estas variaciones y/o modificaciones se considera que está dentro del alcance de las modalidades inventivas descritas aquí. Más en general, los expertos en el arte podrán apreciar fácilmente que todos los parámetros, dimensiones, materiales y configuraciones descritas aquí están destinados a ser ejemplos y que los parámetros, dimensiones, materiales y/o configuraciones reales dependerán de la aplicación o las aplicaciones específicas para las cuales se usan las enseñanzas inventivas. Los expertos en el arte reconocerán, o podrán determinar usando nada más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades inventivas específicas descritas aquí. Por lo tanto, debe entenderse que las modalidades que anteceden se presentan sólo a modo de ejemplo y que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes, las modalidades inventivas pueden practicarse de maneras distintas de las específicamente descritas y reivindicadas. Múltiples modalidades de la presente invención están dirigidas a cada característica, sistema, artículo, material, kit y/o método individual descrito aquí. Además, cualquier combinación de dos o más de estas características, sistemas, artículos, materiales, kits y/o métodos, si estas características, sistemas, artículos, materiales, kits y/o métodos no son mutuamente incompatibles, está incluida dentro del alcance inventivo de la presente divulgación.

Todas las definiciones, como se definen y usan aquí, debe entenderse que mandan por sobre las definiciones de diccionario, definiciones en documentos incorporados por referencia y/o significados comunes de los términos definidos.

Todas las referencias, patentes y solicitudes de patentes divulgadas aquí se incorporan por referencia con respecto a la materia para la cual cada una se cita, lo que en algunos casos puede abarcar la totalidad del documento.

Los artículos indefinidos "un" y "una", como se usan aquí en la memoria y en las reivindicaciones, a menos que claramente se indique lo contrario, deben entenderse como que significan "al menos uno".

La frase "y/o", como se usa aquí en la memoria y en las reivindicaciones, debe entenderse como que significa "uno de ellos o ambos" de los elementos así unidos, o sea, elementos que están presentes en forma conjuntiva en algunos casos y presentes en forma disyuntiva en otros casos. Múltiples elementos enumerados con "y/o" deben interpretarse de la misma manera, o sea, "uno o más" de los elementos así unidos. Otros elementos pueden estar presentes opcionalmente, distintos de los elementos específicamente identificados por la locución "y/o", ya sea relacionados o no relacionados con aquellos elementos específicamente identificados. Así, como un ejemplo no limitante, una referencia a "A y/o B", cuando se usa en conjunto con lenguaje abierto tal como "comprendiendo", puede referirse en una modalidad, a A solamente (opcionalmente incluyendo elementos distintos de B); en otra modalidad, a B solamente (opcionalmente incluyendo elementos distintos de A); en otra modalidad, a ambos A y B (opcionalmente incluyendo otros elementos); etc.

Como se usa aquí en la memoria y en las reivindicaciones, "o" debe entenderse como que tiene el mismo significado que "y/o" definido más arriba. Por ejemplo, cuando separan ítems en una lista, "o" o "y/o" se interpretarán como inclusivos, o sea, la inclusión de al menos uno pero también incluyendo más de uno, de un número o lista de elementos, y opcionalmente ítems no enumerados adicionales. Sólo términos que claramente indican lo contrario, tales como "sólo uno de" o "exactamente uno de" o, cuando

se usa en las reivindicaciones, "consistente en", se referirán a la inclusión de exactamente un elemento de un número o lista de elementos. En general, el término "o", como se usa aquí, solamente se interpretará como que indica alternativas exclusivas (o sea, "uno o el otro pero no ambos") cuando va precedido por términos de exclusividad, tales como "cualquiera de" "uno de", "sólo uno de" o "exactamente uno de". "Consistente esencialmente en", cuando se usa en las reivindicaciones, tendrá su significado común que se usa en el campo de la ley de patentes.

Como se usa aquí en la memoria y en las reivindicaciones, la frase "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos, debe entenderse que significa al menos un elemento seleccionado de cualquier uno o más de los elementos en la lista de elementos, pero no necesariamente incluyendo al menos uno de cada uno y todos los elementos específicamente enumerados dentro de la lista de elementos y sin excluir combinaciones de elementos de la lista de elementos. Esta definición también permite que puedan estar opcionalmente presentes elementos distintos de los elementos específicamente identificados dentro de la lista de elementos a la cual se refiere la frase "al menos uno", ya sea relacionados o no relacionados con aquellos elementos específicamente identificados. Así, como un ejemplo no limitante, "al menos uno de A y B" (o, de manera equivalente, "al menos uno de A o B", o de manera equivalente, "al menos uno de A y/o B") puede referirse, en una modalidad, a al menos un, opcionalmente incluyendo más de un, A, sin B presente (y opcionalmente incluyendo elementos distintos de B); en otra modalidad, a al menos un, opcionalmente incluyendo más de un, B, sin A presente (y opcionalmente incluyendo elementos distintos de A); en otra modalidad, a al menos un, opcionalmente incluyendo más de un, A, y al menos un, opcionalmente incluyendo más de un, B (y opcionalmente incluyendo otros elementos); etc.

También debe entenderse que, a menos que claramente se indique lo contrario, en cualesquier métodos reivindicados aquí que incluyen más de un paso o acto, el orden de los pasos o actos del método no necesariamente está limitado al orden en el cual se citan los pasos o actos del método.

En las reivindicaciones, al igual que en la memoria que antecede, todas las frases de transición tales como "comprendiendo", "incluyendo", "llevando", "teniendo", "conteniendo", "involucrando", "manteniendo", "compuesto de" y similares deben entenderse como abiertas, lo que significa incluyendo pero no limitado a. Sólo las frases de transición "consistente en" y "consistente esencialmente en" serán frases de transición cerradas o semicerradas, respectivamente, como se señala en el Manual de procedimientos de examen de patentes de la Oficina de Patentes de los EE.UU., Sección 2111.03. Se podrá apreciar que modalidades descritas en este documento usando una frase de transición abierta (por ejemplo, "comprendiendo") también se contemplan, en modalidades alternativas, como "consistente en" y "consistente esencialmente en" la característica descrita por la frase de transición abierta. Por ejemplo, si la divulgación describe "una composición comprendiendo A y B", la divulgación también contempla las modalidades alternativas "una composición consistente en A y B" y "una composición consistente esencialmente en A y B".