

VECTORES DE GENOTERAPIA PARA TRATAR ENFERMEDADES CARDÍACAS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica el beneficio de la prioridad de la solicitud provisional estadounidense con número de serie 63/047,633, presentada el 2 de julio de 2020 y la solicitud
5 provisional estadounidense con número de serie 62/976,160, presentada el 13 de febrero de 2020, cuyos contenidos se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO

La presente descripción se refiere a composiciones y métodos para el tratamiento o prevención de enfermedades cardíacas (*por ejemplo*, miocardiopatía) en un sujeto. En particular, la presente
10 descripción se refiere a un vector que comprende una operabilidad del promotor específico cardíaco enlazado a un producto génico terapéutico para el tratamiento de la enfermedad cardíaca (*por ejemplo*, miocardiopatía).

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS

Esta solicitud se presenta electrónicamente a través de EFS-Web e incluye un listado de
15 secuencias presentado electrónicamente en formato .txt. El archivo .txt contiene un listado de secuencias titulado "TENA_015_02WO_SeqList_ST25.txt" creado el 9 de febrero de 2021 y que tiene un tamaño de 824 kilobytes. El listado de secuencias contenido en este archivo .txt es parte de la descripción y se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

20 Los enfoques de genoterapia para el tratamiento de enfermedades cardíacas a menudo emplean vectores configurados para transducir eficazmente células cardíacas y expresar un transgén de una manera específica del tejido cardíaco. Los vectores de virus adenoasociados (AAV),

promotores específicos cardíacos, o ambos en combinación, pueden usarse para suministrar un polinucleótido que codifica un producto génico (*por ejemplo*, una proteína terapéutica) al tejido cardíaco y de esta manera expresar el producto génico en ese tejido para tratar la enfermedad cardíaca. Los promotores específicos cardíacos incluyen promotores de desmina (Des), cadena pesada de alfa-miosina (α -MHC), cadena ligera de miosina 2 (MLC-2) y troponina cardíaca C (TNNC1 o cTnC), así como el promotor de troponina cardíaca T (TNNT2) del par de bases 600. Sin embargo, el suministro de polinucleótidos que codifican proteínas grandes sigue siendo un desafío, en parte debido al límite de empaque de los vectores virales.

Dados estos desafíos, sigue habiendo una necesidad en la técnica de vectores de genoterapia mejorados para enfermedades cardíacas.

COMPENDIO

La presente descripción se refiere generalmente a composiciones y métodos para el tratamiento o prevención de enfermedades cardíacas (*por ejemplo*, miocardiopatía). En un primer aspecto, la presente descripción proporciona vectores que comprenden un promotor, opcionalmente un promotor específico cardíaco, enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un producto génico terapéutico para el tratamiento de la prevención de enfermedades cardíacas, *p. ej.*, miocardiopatía. El vector puede ser un vector viral adenoasociado (AAV).

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un promotor de troponina T cardíaca, que comprende un polinucleótido que tiene entre 300 pb y 500 pb. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que comparte al menos 80 %, al menos 90 %, o al menos 100 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO 1-85. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que comparte al menos 80 %, al menos 90 %, o al menos 100 % de identidad con la SEQ ID NO 1. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que comparte al menos 80 %, al menos 90 %, o al menos 100 % de identidad con la SEQ ID NO 3. En algunas modalidades, el polinucleótido comparte al menos 80

%, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótidos genómicos corriente arriba e incluye el sitio de inicio de la transcripción de un gen de troponina T. En algunas modalidades, el polinucleótido comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótidos genómicos -450 pb a +1 pb en relación con el sitio de inicio de la transcripción de un gen de troponina T. En algunas modalidades, el polinucleótido comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótidos genómicos -350 pb a +1 pb en relación con el sitio de inicio de la transcripción de un gen de troponina T. En algunas modalidades, el polinucleótido comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótidos genómicos -450 pb a +50 pb en relación con el sitio de inicio de la transcripción de un gen de troponina T. En algunas modalidades, el polinucleótido comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótidos genómicos -350 pb a +50 pb en relación con el sitio de inicio de la transcripción de un gen de troponina T. En algunas modalidades, el polinucleótido comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótidos genómicos -250 pb a +50 pb en relación con el sitio de inicio de la transcripción de un gen de troponina T. En algunas modalidades, el gen de troponina T es un gen de troponina T humana.

En algunas modalidades, el promotor es un promotor específico de músculos. En algunas modalidades, el promotor es un promotor específico de las células cardíacas. En algunas modalidades, el promotor es un promotor específico de los cardiomiocitos. En algunas modalidades, el promotor tiene la misma especificidad de tipo celular que un promotor de

troponina T nativa de aproximadamente 600 pb. En algunas modalidades, el promotor descrito en la presente descripción tiene la misma especificidad de tipo celular que un promotor de referencia que comprende la SEQ ID NO 1. En algunas modalidades, el promotor expresa un producto génico enlazado operativamente a este al menos aproximadamente 10 %, al menos

5 aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 % más que un promotor de troponina T nativa. En algunas modalidades, el promotor descrito en la presente descripción expresa un producto génico enlazado operativamente a este al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 % más que un promotor de referencia que comprende la SEQ ID NO 1.

- 10 En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un vector que comprende uno cualquiera de los promotores descritos en la presente descripción enlazados operativamente a un polinucleótido que codifica un producto génico. En algunas modalidades el vector es un vector viral. En algunas modalidades, el vector viral es un vector de virus adenoasociado (AAV). En algunas modalidades, el vector viral tiene un límite de empaque de como máximo
- 15 aproximadamente 5.5 kb.

En algunas modalidades, el producto génico se selecciona de la proteína MYBPC3, KCNH2, TRPM4, DSG2 y ATP2A2. En algunas modalidades, el producto génico se selecciona de CACNA1C, DMD, DMPK, EPG5, EVC, EVC2, FBN1, NF1, SCN5A, SOS1, NPR1, ERBB4, VIP, y proteínas MYH7. En algunas modalidades, el producto génico es un Cas9, seleccionado

20 opcionalmente de SpCas9, St1Cas9, y SaCas9.

En algunas modalidades, el vector descrito en la presente descripción comprende un polinucleótido que codifica un segundo producto génico. En algunas modalidades, el segundo producto génico es un ARN funcional, opcionalmente un microARN o un ARN guía.

- En algunos aspectos, la presente descripción proporciona una célula aislada que comprende uno
- 25 cualquiera de los promotores descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la célula aislada es una célula madre pluripotente inducida o un miocardiocito aislado.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera de los vectores descritos en la presente descripción.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona una composición de terapia celular que comprende una cualquiera de las células aisladas descritas en la presente descripción.

- 5 En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un genoma de vector de virus adenoasociado (AAV) recombinante, que comprende un polinucleótido *MYBPC3* que codifica una proteína MYBPC3, o una variante funcional de esta, y un promotor, en donde el promotor es un polinucleótido que tiene entre 300 pb y 500 pb. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que comparte al menos 80 %, al menos 90 %, o al menos 100 % de
 - 10 identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO 1-85. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia polinucleotídica que comparte al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 100 % de identidad con una cualquiera de la SEQ ID NO 1. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia polinucleotídica que comparte al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 100 % de identidad con una cualquiera de la SEQ ID NO 3. En algunas
 - 15 modalidades, el polinucleótido comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótidos genómicos corriente arriba e incluye el sitio de inicio de la transcripción de un gen de troponina T. En algunas modalidades, el polinucleótido comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótidos genómicos -450 pb a
 - 20 +1 pb en relación con el sitio de inicio de la transcripción de un gen de troponina T. En algunas modalidades, el polinucleótido comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótidos genómicos -350 pb a +1 pb en relación con el sitio de inicio de la transcripción de un gen de troponina T. En algunas modalidades, el polinucleótido comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótidos genómicos -250 pb a
 - 25 +1 pb en relación con el sitio de inicio de la transcripción de un gen de troponina T. En algunas

modalidades, el polinucleótido comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótidos genómicos -450 pb a +50 pb en relación con el sitio de inicio de la transcripción de un gen de troponina T. En algunas modalidades, el polinucleótido comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótidos genómicos -350 pb a +50 pb en relación con el sitio de inicio de la transcripción de un gen de troponina T. En algunas modalidades, el polinucleótido comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con una secuencia de polinucleótidos genómicos -250 pb a +50 pb en relación con el sitio de inicio de la transcripción de un gen de troponina T. En algunas modalidades, el gen de troponina T es un gen de troponina T humana.

En algunas modalidades, el promotor es un promotor específico de músculos. En algunas modalidades, el promotor es un promotor específico de las células cardíacas. En algunas modalidades, el promotor es un promotor específico de los cardiomiocitos. En algunas modalidades, el promotor tiene la misma especificidad de tipo celular que un promotor de troponina T nativa de aproximadamente 600 pb. En algunas modalidades, el promotor tiene la misma especificidad de tipo celular que un promotor de referencia que comprende la SEQ ID NO 1. En algunas modalidades, el promotor expresa un producto génico enlazado operativamente a este al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 % más que un promotor de troponina T nativa. En algunas modalidades, el promotor expresa un producto génico enlazado operativamente a este al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 % más que un promotor de referencia que comprende la SEQ ID NO 1.

En algunas modalidades, el genoma del vector de virus adenoasociado (AAV) recombinante descrito en la presente descripción comprende un polinucleótido *MYBPC3* que codifica una proteína MYBPC3. En algunas modalidades, el polinucleótido *MYBPC3* comprende al menos aproximadamente 3.5 kB. En algunas modalidades, el polinucleótido *MYBPC3* comprende

aproximadamente 3.8 kB. En algunas modalidades, la MYBPC3 es una MYBPC3 de longitud completa. En algunas modalidades, la MYBPC3 es una MYBPC3 truncada.

En algunas modalidades, el genoma del vector de rAAV descrito en la presente descripción expresa MYBPC3. En algunas modalidades, el genoma del vector de rAAV expresa MYBPC3 a

5 aproximadamente el mismo nivel que un vector de AAV de referencia que comprende un promotor de troponina T nativa de aproximadamente 600 pb. En algunas modalidades, el genoma del vector de rAAV expresa MYBPC3 a un nivel al menos aproximadamente 10 % mayor que un vector de AAV de referencia que comprende un promotor de troponina T nativa de aproximadamente 600 pb. En algunas modalidades, el genoma del vector de rAAV expresa
10 MYBPC3 a un nivel al menos aproximadamente 20 % mayor que un vector de AAV de referencia que comprende un promotor de troponina T nativa de aproximadamente 600 pb.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un genoma de vector de virus adenoasociado (AAV) recombinante, que comprende un casete de expresión que comprende, en orden de 5' a 3', un segmento 5' que comprende un promotor; un polinucleótido que codifica un

15 producto génico; y un segmento 3' que comprende una señal de poliA, el casete de expresión opcionalmente flanqueado por uno o ambos de una repetición terminal invertida 5' (ITR) y una ITR 3', en donde el polinucleótido que codifica el producto génico comprende entre 3 kb y 11 kb, entre 3 kb y 5 kb, entre 3.5 kb y 4.5 kb, o entre 3.7 kb y 4 kb; y en donde: a) el segmento 5' y el segmento 3' juntos comprenden como máximo 0.8 kpb o como máximo 0.9 kpb; b) la ITR 5', el
20 segmento 5', el segmento 3' y la ITR 3' juntos comprenden o como máximo 1.2 kpb o como máximo 1.3 kpb; y/o c) el genoma del vector comprende como máximo 4.7 kpb, como máximo 4.8 kpb, como máximo 4.9 kpb, o como máximo 5.0 kpb. En algunas modalidades, el segmento 5' comprende como máximo 500 pb o como máximo 480 pb. En algunas modalidades, el segmento 3' comprende como máximo 200 pb o como máximo 150 pb.

25 En algunas modalidades, el genoma del vector de rAAV comprende un polinucleótido que codifica un producto génico que comprende de 3.7 kpb a 3.9 kpb, opcionalmente 3.8 kpb. En algunas

modalidades, el producto génico es MYBPC3, o una variante funcional de este. En algunas modalidades, el producto génico es MYBPC3. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica MYBPC3 comparte al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO 86. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica MYBPC3 comparte al menos 95 % de identificación con la SEQ ID NO 86. En algunas modalidades el polinucleótido que codifica MYBPC3 es la SEQ ID NO 86. En algunas modalidades, MYBPC3 comparte al menos 90 % de identidad con la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO 103. En algunas modalidades, MYBPC3 comparte al menos 95 % de identidad con la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO 103. En algunas modalidades, MYBPC3 comparte 100 % de identidad con la secuencia de polipéptidos de la SEQ ID NO 103.

En algunas modalidades, el genoma del vector de rAAV comprende un promotor, en donde el promotor es un polinucleótido que tiene entre 300 pb y 500 pb. En algunas modalidades el promotor comprende una secuencia que comparte al menos 80 % de identidad con la SEQ ID NO 1-85 o la SEQ ID NO 91. En algunas modalidades el promotor comprende una secuencia que comparte al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO 1-85 o la SEQ ID NO 91. En algunas modalidades el promotor comprende una secuencia que comparte al menos 100 % de identidad con la SEQ ID NO 1-85 o la SEQ ID NO 91.

En algunas modalidades, el genoma del vector de rAAV comprende una señal de poliA. En algunas modalidades, la señal de poliA comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia que comparte al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO 92. En algunas modalidades, la señal de poliA comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia que comparte al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO 92. En algunas modalidades, la señal de poliA es la SEQ ID NO 92.

En algunas modalidades, el genoma del vector de rAAV comprende un segmento 5'. En algunas modalidades, el segmento 5' comparte al menos 80 % de identidad con la SEQ ID NO 93. En algunas modalidades, el segmento 5' comparte al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO

93. En algunas modalidades, el segmento 5' comparte al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO 93. En algunas modalidades, el segmento 5' es la SEQ ID NO 93.

En algunas modalidades, el genoma del vector de rAAV comprende un segmento 3'. En algunas modalidades, el segmento 3' comparte al menos 80 % de identidad con la SEQ ID NO 94. En algunas modalidades, el segmento 3' comparte al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO 94. En algunas modalidades, el segmento 3' comparte al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO 94. En algunas modalidades, el segmento 3' es la SEQ ID NO 94.

En algunas modalidades, el genoma del vector de rAAV comprende un casete de expresión. En algunas modalidades, el casete de expresión comparte al menos 80 % de identidad con la SEQ ID NO 95. En algunas modalidades, el casete de expresión comparte al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO 95. En algunas modalidades, el casete de expresión comparte al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO 95. En algunas modalidades, el casete de expresión es la SEQ ID NO 95.

En algunas modalidades, el genoma de rAAV comprende un casete de expresión flanqueado por una o ambas de una repetición terminal invertida 5' (ITR) y una ITR 3'. En algunas modalidades, la ITR 5' comprende una secuencia que comparte 95 % de identidad con la SEQ ID NO 96. En algunas modalidades, la ITR 3' comprende una secuencia que comparte al menos 95 % de identidad con la SEQ ID NO 97.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un virión de AAV recombinante (rAAV).

En algunas modalidades, el virión de rAAV comprende uno cualquiera de los genomas del vector de rAAV descritos en la presente descripción y una proteína de la cápside de AAV.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para expresar una proteína MYBPC3 en una célula, que comprende transducir la célula con un virión de rAAV descrito en la presente descripción o uno cualquiera de los genomas del vector de rAAV descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, la célula es una célula *MYBPC3*^{-/-}. En algunas

modalidades, la célula comprende una mutación inactivante en una o ambas copias del gen *MYBPC3* endógeno.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para tratar y/o prevenir una miocardiopatía en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar el virión de rAAV descrito en la presente descripción o uno cualquiera de los genomas del vector de rAAV descritos en la presente descripción al sujeto, en donde opcionalmente el sujeto padece o está en riesgo de miocardiopatía.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para expresar una proteína MYBPC3 en el corazón de un sujeto que lo necesita, que comprende administrar el virión de rAAV descrito en la presente descripción o uno cualquiera de los genomas del vector de rAAV descritos en la presente descripción al sujeto, opcionalmente un sujeto que padece o está en riesgo de miocardiopatía, en donde opcionalmente el sujeto padece o está en riesgo de miocardiopatía.

En algunas modalidades, la administración del vector de AAV provoca la expresión específica de MYBPC3 en el corazón del sujeto. En algunas modalidades, la administración del vector de AAV provoca una expresión baja o indetectable de MYBPC3 en el tejido esquelético, el cerebro y/o el hígado del sujeto, en donde opcionalmente el sujeto padece o está en riesgo de miocardiopatía.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad causada por una mutación de MYBPC3 en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar el virión de rAAV descrito o uno cualquiera de los genomas del vector de rAAV descritos en la presente descripción al sujeto, en donde opcionalmente el sujeto padece o está en riesgo de miocardiopatía.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para aumentar la actividad de MYBPC3 y/o aumentar la función cardíaca en el corazón de un sujeto que lo necesita, que comprende administrar el virión de rAAV descrito en la presente descripción o uno cualquiera de los genomas del vector de rAAV descritos en la presente descripción al sujeto, en donde opcionalmente el sujeto padece o está en riesgo de miocardiopatía.

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción tratan la miocardiopatía. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción previenen la miocardiopatía. En algunas modalidades, la miocardiopatía es miocardiopatía hipertrófica.

- 5 En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden la administración intravenosa del virión de rAAV descrito en la presente descripción o uno cualquiera de los genomas del vector de rAAV descritos en la presente descripción al sujeto. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden la administración intracardíaca del virión de rAAV descrito en la presente descripción o uno cualquiera de los
- 10 genomas del vector de rAAV descritos en la presente descripción al sujeto. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden la inyección directa del virión de rAAV descrito en la presente descripción o uno cualquiera de los genomas del vector de rAAV descritos en la presente descripción al sujeto. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden administrar una dosis de aproximadamente 10^{11}
- 15 a aproximadamente 10^{14} viriones de rAAV por kg o genomas virales por kg.

En algunas modalidades, el sujeto es un mamífero. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano. En algunas modalidades, el sujeto es un adulto.

- En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente descripción son para usar como un medicamento en el tratamiento terapéutico o profiláctico de enfermedades
- 20 cardíacas, *p. ej.*, miocardiopatías.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1A** muestra mapas de secuencias de insertos para genomas de vectores de AAV adaptados para cargas grandes, mostrando la delección o truncamiento de dos elementos reguladores *cis*.

La **Figura 1B** muestra el análisis de citometría de flujo, dos días después de la infección, de fibroblastos cardíacos humanos ($n = 2$), MOI 160,000 con construcciones empaquetadas con AAV.

La **Figura 1C** muestra un mapa de una secuencia de insertos para un genoma de vector de AAV adaptado para cargas grandes, que muestra la delección o truncamiento de dos elementos reguladores *cis*, la delección del intrón, y la delección parcial de la secuencia de ITR 3' a 5'.

La **Figura 2A** muestra un esquema de las versiones original y alterada de un genoma viral que comprende el promotor de troponina cardíaca específica (TNNT2) y el transgén de proteína C de unión a miosina (MYBPC3).

La **Figura 2B** muestra la detección de la proteína MYBPC3 mediante inmunofluorescencia en cardiomiocitos derivados de iPSC *MYBPC3*^{-/-} transducidos con construcciones empaquetadas con AAV6 que codifican MYBPC3 impulsado por el promotor de TNNT2 específico cardíaco.

La **Figura 3A** muestra la detección de la proteína MYBPC3 mediante inmunoelectrotransferencia en cardiomiocitos derivados de iPSC *MYBPC3*^{-/-} transducidos con construcciones empaquetadas con AAV6 que codifican MYBPC3 humano impulsado por diversos tamaños (400-600 pb) del promotor de TNNT2 específico cardíaco. El GAPDH se usó como control de carga.

La **Figura 3B** muestra la detección de la proteína MYBPC3 mediante inmunoelectrotransferencia en cardiomiocitos derivados de iPSC *MYBPC3*^{-/-} transducidos con construcciones empaquetadas con AAV6 que codifican MYBPC3 humano impulsado por diversos tamaños (400 o 600 pb) del promotor de TNNT2 cardíaco humano. No se usó secuencia Kozak como control negativo y se usó GAPDH como control de carga.

La **Figura 3C** muestra la detección de la proteína MYBPC3 mediante inmunoelectrotransferencia en cardiomiocitos derivados de iPSC *MYBPC3*^{-/-} transfectados con plásmidos AAV6 que codifican MYBPC3 humano impulsado por diversos tamaños (400 o 600 pb) del promotor de TNNT2 cardíaco humano. El GAPDH se usó como control de carga.

La **Figura 4A** muestra un mapa de los intrones del gen *Mybpc3* y una transferencia de puntos de la expresión de la proteína MYBPC3 en el ratón fundador de la línea KO.

La **Figura 4B** muestra un gráfico de barras del peso corporal de los ratones de tipo silvestre (WT) o KO (*Mybpc3*^{-/-}) de compañeros de camada a las dos semanas de vida. WT (n = 11), *Mybpc3*^{+/-} (n = 7) y *Mybpc3*^{-/-} (n = 13).

La **Figura 4C** muestra un gráfico de barras de la fracción de eyección (%) medida por ecocardiografía en ratones de tipo silvestre (WT), heterocigotos KO (*Mybpc3*^{+/-}) u homocigotos KO (*Mybpc3*^{-/-}) a las dos semanas de vida.

La **Figura 4D** muestra un gráfico de barras de acortamiento fraccional medido por ecocardiografía en ratones de tipo silvestre (WT), ratones heterocigotos KO (*Mybpc3*^{+/-}) o ratones homocigotos KO (*Mybpc3*^{-/-}) a las dos semanas de vida.

La **Figura 4E** muestra un gráfico de barras de la masa ventricular izquierda (LV) normalizada por el peso corporal (BW) en ratones de tipo silvestre (WT), ratones heterocigotos KO (*Mybpc3*^{+/-}) o ratones homocigotos KO (*Mybpc3*^{-/-}) a las dos semanas de vida.

La **Figura 4F** muestra un gráfico de barras del diámetro interno ventricular izquierdo durante la sístole (LVID) normalizado por el peso corporal en ratones de tipo silvestre (WT), ratones heterocigotos KO (*Mybpc3*^{+/-}) o ratones homocigotos KO (*Mybpc3*^{-/-}) a las dos semanas de vida.

La **Figura 4G** muestra un gráfico de barras del diámetro interno ventricular izquierdo durante la diástole (LVIDd) normalizado por el peso corporal en ratones de tipo silvestre (WT), ratones heterocigotos KO (*Mybpc3*^{+/-}) o ratones homocigotos KO (*Mybpc3*^{-/-}) a las dos semanas de vida.

La **Figura 5** muestra la detección del ARNm de MYBPC3 mediante qRT-PCR en tejido cardíaco, esquelético, cerebral y hepático recolectado de ratones inyectados retroorbitalmente con construcciones empaquetadas con AAV9 de GC E12 que codifican MYBPC3 humano impulsado por varios tamaños (400 o 600 pb) del promotor de TNNT2 cardíaco humano.

La **Figura 6A** muestra un gráfico de barras que muestra la cuantificación absoluta de genomas de vectores por microgramo de ADN genómico en el corazón y el hígado de ratones adultos 4

semanas después de la administración intravenosa con un vector AAV9 que contiene el casete promotor de TNNT2 modificado de 400 pb.

La **Figura 6B** muestra un gráfico de barras que muestra un aumento en veces sobre el vehículo del ARN del transgén en el corazón y el hígado de ratones adultos 4 semanas después de la administración intravenosa con un vector AAV9 que contiene el casete promotor de TNNT2 modificado de 400 pb.

La **Figura 7** muestra una inmunoelectrotransferencia de la expresión de la proteína MYBPC3 en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos inyectados retroorbitalmente a las dos semanas de vida con un vector de prueba de 1E14 vg·kg⁻¹ que codifica *Mybpc3* o vehículo, HBSS.

La **Figura 8** muestra un gráfico de barras que muestra la expresión de MYBPC3 en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos inyectados retroorbitalmente a las dos semanas de vida 3E13 vg·kg⁻¹ y 1E14 vg·kg⁻¹ vector de prueba que codifica *Mybpc3* o vehículo, HBSS.

La **Figura 9A** muestra un gráfico de barras que muestra la masa ventricular izquierda normalizada al peso corporal (LVM/BM) en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos 6 semanas después de que se inyectaron retroorbitalmente a las dos semanas de vida con 1E13 vg·kg⁻¹, 3E13 vg·kg⁻¹ y 1E14 vg·kg⁻¹ del vector de prueba que codifica *Mybpc3* o el vehículo, HBSS.

La **Figura 9B** muestra un gráfico de barras que muestra el FAS expresado como % de cambio porcentual en las dimensiones internas del LV entre la sístole y la diástole en ratones homocigotos *Mybpc3*^{-/-} 6 semanas después de que se inyectaron retroorbitalmente a las dos semanas de vida con 1E13 vg·kg⁻¹, 3E13 vg·kg⁻¹ y 1E14 vg·kg⁻¹ del vector de prueba que codifica *Mybpc3* o el vehículo, HBSS.

La **Figura 9C** muestra un gráfico de barras que muestra la fracción de eyección en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos 6 semanas después de que se inyectaron retroorbitalmente a las dos semanas de vida con 1E13 vg·kg⁻¹, 3E13 vg·kg⁻¹ y 1E14 vg·kg⁻¹ del vector de prueba que codifica *Mybpc3* o el vehículo, HBSS.

La **Figura 9D** muestra un gráfico de barras que muestra la masa ventricular izquierda normalizada al peso corporal (LVM/BM) en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos 31 semanas después de que se inyectaron retroorbitalmente a las dos semanas de vida con 1E13 vg·kg⁻¹, 3E13 vg·kg⁻¹ y 1E14 vg·kg⁻¹ del vector de prueba que codifica *Mybpc3* o el vehículo, HBSS.

5 La **Figura 9E** muestra un gráfico de barras que muestra el FAS expresado como % de cambio porcentual en las dimensiones internas del LV entre la sístole y la diástole en ratones homocigotos *Mybpc3*^{-/-} 31 semanas después de que se inyectaron retroorbitalmente a las dos semanas de vida con 1E13 vg·kg⁻¹, 3E13 vg·kg⁻¹ y 1E14 vg·kg⁻¹ del vector de prueba que codifica *Mybpc3* o el vehículo, HBSS.

10 La **Figura 9F** muestra un gráfico de barras que muestra la fracción de eyección en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos 31 semanas después de que se inyectaron retroorbitalmente a las dos semanas de vida con 1E13 vg·kg⁻¹, 3E13 vg·kg⁻¹ y 1E14 vg·kg⁻¹ del vector de prueba que codifica *Mybpc3* o el vehículo, HBSS.

La **Figura 10A** es una ilustración de un vector de AAV9 que codifica *Mybpc3* en el contexto de los casetes de expresión de 5.4 kpb o 4.7 kpb.

La **Figura 10B** es un gráfico de barras que muestra la fracción de eyección en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos 18 semanas después de que se inyectaron retroorbitalmente a los tres meses de edad con 3E13 vg·kg⁻¹ o 1E14 vg·kg⁻¹ del vector AAV9 que codifica *Mybpc3* en el contexto de los casetes de 5.4 kpb o 4.7 kpb o inyectados con el control del vehículo, HBSS.

20 La **Figura 10C** es un gráfico que muestra la progresión de la fracción de eyección en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos después de que se inyectaron retroorbitalmente a los tres meses de edad con 3E13 vg·kg⁻¹ o 1E14 vg·kg⁻¹ del vector AAV9 que codifica *Mybpc3* en el contexto de los casetes de 5.4 kpb o 4.7 kpb o inyectados con el control del vehículo, HBSS.

La **Figura 10D** es un gráfico de barras que muestra la masa ventricular izquierda normalizada al peso corporal (LVM/BM) en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos 18 semanas después de que se inyectaron retroorbitalmente a los tres meses de edad con 3E13 vg·kg⁻¹ o 1E14 vg·kg⁻¹ del vector

AAV9 que codifica *Mybpc3* en el contexto de los casetes de 5.4 kpb o 4.7 kpb o inyectados con el control del vehículo, HBSS.

La **Figura 11A** es un gráfico de barras que muestra la expresión de GFP en el tejido cardíaco después del suministro sistémico de una variante de la cápside de AAV9, CR9-10, con un casete codificante de GFP o AAV9 con un casete codificante de GFP en ratones adultos ($p < 0.05$, ANOVA unidireccional; prueba de comparación múltiple de Dunnett).

La **Figura 11B** es un gráfico de barras que muestra la fracción de eyección en ratones *Mybpc3*^{-/-} inyectados retroorbitalmente a las dos semanas de vida con 1E13 vg·kg⁻¹ y 3E13 vg·kg⁻¹ del vector AAV9 que codifica *Mybpc3*, CR9-10 vector que codifica *Mybpc3* o HBSS de control de vehículo.

La **Figura 11C** es un gráfico de barras que muestra la fracción de eyección en comparación con el valor inicial antes de la dosis (ΔEF) en ratones *Mybpc3*^{-/-} inyectados retroorbitalmente a las dos semanas de vida con 1E13 vg·kg⁻¹ y 3E13 vg·kg⁻¹ del vector AAV9 que codifica un casete de expresión del gen *Mybpc3*, CR9-10 vector que codifica un casete de expresión del gen *Mybpc3* o HBSS de control de vehículo.

La **Figura 12A** es un gráfico de barras que muestra la expresión de la GFP en el ventrículo izquierdo de primates no humanos un mes después del suministro intravenoso de una dosis de 1E13 vg·kg⁻¹ de vector de AAV que codifica la GFP empaquetada en una de las catorce proteínas de la cápside diferentes.

La **Figura 12B** es un gráfico de barras que muestra la expresión de la GFP en el hígado de primates no humanos un mes después del suministro intravenoso de una dosis de 1E13 vg·kg⁻¹ de vector de AAV que codifica la GFP empaquetada en una de las catorce proteínas de la cápside diferentes.

La **Figura 12C** es un gráfico de barras que muestra la relación de expresión de la GFP en el ventrículo izquierdo:hígado de primates no humanos un mes después del suministro intravenoso

de una dosis de $1\text{E}13 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de vector de AAV que codifica la GFP empaquetada en una de las catorce proteínas de la cápside diferentes.

La **Figura 13A** es un gráfico que muestra la progresión de la fracción de eyección en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos a los que se les inyectó retroorbitalmente a las dos semanas de vida con AAV9 que codifica el gen *Mybpc3* de ratón (mMybpc3) (a $1\text{E}14 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$), AAV9 que codifica el gen *MYBPC3* humano (hMYBPC3) (a $1\text{E}14 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$) o vehículo, HBSS.

La **Figura 13B** es un gráfico que muestra la masa ventricular izquierda normalizada a la progresión del peso corporal (LVM/BW) en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos a los que se les inyectó retroorbitalmente a las dos semanas de vida con AAV9 que codifica el gen *Mybpc3* de ratón (mMybpc3) (a $1\text{E}14 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$), AAV9 que codifica el gen *MYBPC3* humano (hMYBPC3) (a $1\text{E}14 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$) o vehículo, HBSS.

La **Figura 13C** es un gráfico de barras del grosor de la pared posterior ventricular izquierda durante la diástole (LVPW;d) en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos a los que se les inyectó retroorbitalmente a las dos semanas de vida con AAV9 que codifica el gen *Mybpc3* de ratón (mMybpc3) (a $1\text{E}14 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$), AAV9 que codifica el gen *MYBPC3* humano (hMYBPC3) (a $1\text{E}14 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$) o vehículo, HBSS.

La **Figura 14A** es un gráfico de barras que muestra la fracción de eyección en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos que se inyectaron retroorbitalmente a las dos semanas de vida con $1\text{E}13 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $1\text{E}14 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $3\text{E}14 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$ del vector de prueba que codifica el gen *MYBPC3* humano o el vehículo, HBSS.

La **Figura 14B** es un gráfico de barras que muestra la fracción de eyección en comparación con el valor inicial antes de la dosis (ΔEF) en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos que se inyectaron retroorbitalmente a las dos semanas de vida con $1\text{E}13 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $1\text{E}14 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $3\text{E}14 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$ del vector de prueba que codifica el gen *MYBPC3* humano o el vehículo, HBSS.

La **Figura 14C** es un gráfico de barras que muestra la masa ventricular izquierda normalizada al peso corporal (LVM/BW) en ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos que se inyectaron retroorbitalmente

a las dos semanas de vida con $1\text{E}13 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $1\text{E}14 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $3\text{E}14 \text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$ del vector de prueba que codifica el gen *MYBPC3* humano o el vehículo, HBSS.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 La presente descripción proporciona composiciones y métodos para genoterapia en células cardíacas y/o con genes grandes. Los polinucleótidos y vectores descritos pueden usarse en el tratamiento o la prevención de enfermedades (*p. ej.*, enfermedad cardíaca, tal como miocardiopatía). La presente descripción proporciona promotores cardíacos específicos, casetes de expresión, genomas virales de virus adenoasociados recombinantes (rAAV), viriones de rAAV,

10 composiciones farmacéuticas, y métodos de uso. Los casetes de expresión y los genomas virales de rAAV pueden comprender un promotor específico cardíaco enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un producto génico. El producto génico puede ser un producto génico terapéutico, tal producto génico terapéutico usado para tratar y/o prevenir enfermedades cardíacas, *p. ej.*, miocardiopatía. La descripción proporciona además genomas virales de rAAV y

15 casetes de expresión modificados genéticamente para suministrar y expresar un producto génico grande. En algunas modalidades, el genoma del vector comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido MYBPC3, o una variante funcional de este y un promotor. En algunas modalidades, el promotor es un promotor de troponina T cardíaca (*es decir*, un promotor de TNNT2). En algunas modalidades, el genoma del vector de rAAV comprende un casete de expresión que comprende

20 un polinucleótido que codifica un producto génico, *p. ej.*, MYBPC3 y un promotor, *p. ej.*, promotor de TNNT2, flanqueado por una o más secuencias de polinucleótidos de repetición terminal invertida. En algunas modalidades, el virión de rAAV comprende un polinucleótido que comprende un genoma del vector de rAAV como se describe en la presente descripción y una proteína de la cápside de AAV. La presente descripción también proporciona composiciones

25 farmacéuticas que comprenden los genomas del vector, los genomas del vector de rAAV, y los

viriones de rAAV descritos en la presente descripción. También se proporcionan métodos para tratar y/o prevenir una miocardiopatía en un sujeto que comprenden administrar los viriones o genomas de vectores de rAAV descritos en la presente descripción.

Otras modalidades, características, y ventajas de la invención serán evidentes y abarcadas por la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

I. Definiciones

Como se usa en esta descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referencias plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

Como se usa en esta descripción, el término “y/o” se usa en esta descripción para significar ya sea “y” u “o” a menos que se indique lo contrario.

A lo largo de esta descripción, a menos que el contexto requiera lo contrario, las palabras “comprende”, o variaciones tales como “comprenden” o “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un elemento indicado o un número entero o grupo de elementos o números enteros pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Como se usa en esta solicitud, los términos “alrededor de” y “aproximadamente” se usan como equivalentes. Cualquier número usado en esta solicitud con o sin alrededor de/aproximadamente pretende cubrir cualquier fluctuación normal apreciada por un experto en la técnica pertinente. En determinadas modalidades, el término “aproximadamente” o “alrededor de” se refiere a un rango de valores que se encuentran dentro de 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos en cualquier dirección (mayor que o menor que) del valor de referencia indicado, a no ser que se indique lo contrario o resulte evidente por el contexto (excepto cuando dicho número supere el 100 % de un valor posible).

Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico”, usados indistintamente en la presente descripción, se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de más de aproximadamente 100

nucleótidos, ya sea ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Por lo tanto, este término incluye, de modo no taxativo, ADN o ARN monocatenario, bicatenario o multicatenario, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN, o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases de nucleótidos naturales, modificadas químicamente o bioquímicamente, no naturales o derivatizadas. “Oligonucleótido” generalmente se refiere a polinucleótidos de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 100 nucleótidos de ADN monocatenario o bicatenario. Sin embargo, para los fines de esta descripción, no hay límite superior a la longitud de un oligonucleótido. Los oligonucleótidos también se conocen como “oligómeros” u “oligos” y pueden aislarse de genes, o sintetizarse químicamente mediante métodos conocidos en la técnica. Los términos “polinucleótido” y “ácido nucleico” deben entenderse que incluyen, según corresponda a las modalidades que se describen, polinucleótidos monocatenarios (tales como de sentido o antisentido) y bicatenarios.

El término “promotor” como se usa en la presente descripción se refiere a una secuencia de polinucleótidos que tiene uno o más sitios de reconocimiento a los que se une una polimerasa de ARN, de manera que en una célula huésped o diana, una polimerasa de ARN puede iniciar y transcribir una secuencia de polinucleótido “corriente abajo” del promotor en un ARN. De manera similar, un “promotor” se une operativamente o se une operativamente a una secuencia de polinucleótidos si en una célula huésped o diana en la que el promotor está activo, una polimerasa de ARN inicia la transcripción del polinucleótido en un sitio de estado de transcripción. Los promotores operativos en células de mamíferos generalmente comprenden una región rica en AT ubicada aproximadamente de 25 a 30 bases corriente arriba del sitio donde se inicia la transcripción y/u otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases corriente arriba desde el inicio de la transcripción, una región CNCAAT donde N puede ser cualquier nucleótido.

Los términos “corriente arriba” y “extremo corriente arriba” se refieren a una porción de un polinucleótido que es, con referencia a un sitio de inicio de la transcripción (TSS), 5’ al TSS en la cadena sentido (o cadena codificante) del polinucleótido; y 3’ al TSS en la cadena antisentido del

- polinucleótido. Los términos “corriente abajo” y “extremo corriente abajo” se refieren a una porción de un polinucleótido que es, con referencia a un TSS, 3’ a TSS en la cadena sentido (o cadena codificante) del polinucleótido; y 5’ al TSS en la cadena antisentido del polinucleótido. Por lo tanto, una delección del extremo corriente arriba de un promotor es una delección de uno o más pares de bases en la región no transcrita del polinucleótido, 5’ al TSS en la cadena sentido (o equivalentemente, 3’ al TSS en la cadena antisentido). Una delección del extremo corriente abajo de un promotor es una delección de uno o más pares de bases en la región transcrita del polinucleótido, 3’ al TSS en la cadena sentido (o equivalentemente, 5’ al TSS en la cadena antisentido).
- 10 Como se usa en la presente descripción, el término “transgén” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína o ARN (*por ejemplo*, una proteína terapéutica), que es parcial o totalmente heterólogo, *es decir*, extraño, al animal o célula transgénica en la que se introduce o, es homólogo a un gen endógeno del animal o célula transgénica en la que se introduce, pero que está diseñada para insertarse, o se inserta, en el genoma del animal de
- 15 manera tal que altere el genoma de la célula en la que se inserta (*p. ej.*, se inserta en una ubicación que difiere de la del gen natural o su inserción da como resultado una inactivación). Un transgén puede incluir una o más secuencias reguladoras de transcripción y cualquier otro ácido nucleico, tal como intrones, que pueden ser necesarios para la expresión óptima de un ácido nucleico seleccionado.
- 20 El término “identidad de secuencia” se refiere al porcentaje de bases o aminoácidos entre dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos que son iguales, y en la misma posición relativa. Como tal, una secuencia de polinucleótido o polipéptido tiene un determinado porcentaje de identidad de secuencia en comparación con otra secuencia de polinucleótido o polipéptido. Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de
- 25 referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. El término “secuencia de referencia” se refiere a una molécula con la que se compara una secuencia de prueba.

Los métodos de alineación de secuencias para la comparación y determinación del porcentaje de identidad de secuencia se conocen bien en la técnica. Se puede realizar una alineación óptima de las secuencias para la comparación, *p. ej.*, mediante el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci EE. UU.* 85:2444 (1988), mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), mediante alineación manual e inspección visual (véase, *p. ej.*, Brent *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (2003)), mediante el uso de algoritmos conocidos en la técnica incluidos los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977); y Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), respectivamente. El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica.

En algunas modalidades, la determinación del porcentaje de identidad de secuencia puede tener lugar después de una alineación local. Tales alineaciones se conocen bien en la técnica, por ejemplo, el servicio EMBOSS Matcher identifica similitudes locales entre dos secuencias mediante el uso de un algoritmo basado en la aplicación LALIGN, versión 2.0u4. En un ejemplo, la identidad entre dos secuencias de ácido nucleico puede calcularse mediante el uso del servicio Matcher (EMBOSS) establecido en los parámetros predeterminados, *p. ej.*, matriz (ADN completo), espacio abierto (16), espacio extendido (4), coincidencias alternativas (1).

Un “casete de expresión” o “construcción de expresión” se refiere a una secuencia de polinucleótidos de ADN enlazada operativamente a un promotor. “Enlazado de manera operativa” o “enlazado operativamente” se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos así están en una relación que les permite funcionar de su manera prevista. Por ejemplo, un promotor se une operativamente a una secuencia de polinucleótidos si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia de polinucleótidos.

Como se usa en la presente descripción, el término “suministro”, que se usa indistintamente con “transducción”, se refiere al proceso mediante el cual las moléculas de ácido nucleico exógeno se transfieren a una célula de manera que se ubican dentro de la célula. El suministro de ácidos nucleicos es un proceso distinto de la expresión de ácidos nucleicos.

- 5 El término “modificado” se refiere a una sustancia o compuesto (*por ejemplo*, una célula, una secuencia de polinucleótidos, y/o una secuencia de polipéptidos) que se ha alterado o cambiado en comparación con la sustancia o compuesto no modificado correspondiente.

El término “muestra” se refiere a una composición biológica (*por ejemplo*, una célula o una porción de un tejido) que se somete a análisis y/o modificación genética. En algunas modalidades, una muestra es una “muestra primaria” en que se obtiene directamente de un sujeto; en algunas modalidades, una “muestra” es el resultado del procesamiento de una muestra primaria, por ejemplo, para eliminar determinados componentes y/o para aislar o purificar determinados componentes de interés.

El término “gen” o “gen recombinante” se refiere a un ácido nucleico que comprende un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido, que incluye tanto secuencias de exón como (opcionalmente) secuencias de intrones.

El término “transfección” se refiere a la absorción de ADN extraño por parte de una célula. Una célula ha sido “transfectada” cuando se ha introducido ADN exógeno dentro de la membrana celular. Una cantidad de técnicas de transfección se conocen generalmente en la técnica. Véase, *p. ej.*, Graham y otros, *Virology* 52:456 (1973); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1989); Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology* (1986); Chu et al., *Gene* 13:197 (1981). Tales técnicas pueden usarse para introducir una o más porciones de ADN exógeno, tal como un vector de integración de nucleótidos y otras moléculas de ácido nucleico, en células huésped adecuadas. El término captura los procedimientos de transfección química y eléctrica.

25 El término “expresión” se refiere al proceso mediante el cual un ácido nucleico se traduce en péptidos o se transcribe en ARN, que, por ejemplo, puede traducirse en péptidos, polipéptidos o

proteínas. Si el ácido nucleico se deriva del ADN genómico, la expresión puede, si se selecciona una célula huésped u organismo eucariotas adecuadas, incluir el empalme del ARNm. Para que el ácido nucleico heterólogo se exprese en una célula huésped, inicialmente debe administrarse en la célula y luego, una vez en la célula, finalmente residir en el núcleo.

- 5 El término “genoterapia” implica la transferencia de ADN heterólogo a células de un mamífero, particularmente un humano, con un trastorno o afecciones para los cuales se busca terapia o diagnóstico. El ADN se introduce en las células diana seleccionadas de manera que se expresa el ADN heterólogo y se produce de esta manera un producto terapéutico codificado. Alternativamente, el ADN heterólogo puede de alguna manera mediar la expresión del ADN que
- 10 codifica el producto terapéutico; puede codificar un producto, tal como un péptido o ARN que de alguna manera media, directa o indirectamente, la expresión de un producto terapéutico. La genoterapia también puede usarse para administrar ácido nucleico que codifica un producto génico para reemplazar un gen defectuoso o complementar un producto génico producido por el mamífero o la célula en la que se introduce. El ácido nucleico introducido puede codificar un
- 15 producto génico terapéutico que no se produce normalmente en el huésped de mamífero o que no se produce en cantidades terapéuticamente eficaces o en un tiempo terapéuticamente útil. El ADN heterólogo que codifica el producto terapéutico puede modificarse antes de la introducción en las células del huésped afectado para mejorar o de cualquier otra manera alterar el producto o expresión de este.
- 20 Como se usa en la presente descripción, un polinucleótido o ácido nucleico “heterólogo” se refiere a un polinucleótido o porción de un polinucleótido derivado de una fuente que no sea el organismo huésped o, para un vector viral, el virus nativo no recombinante. Los ejemplos de ADN heterólogo incluyen, pero no se limitan a, ADN que codifica proteínas marcadoras rastreables, tales como una proteína que confiere resistencia al fármaco, ADN que codifica sustancias terapéuticamente
- 25 eficaces, tales como agentes antineoplásicos, enzimas y hormonas, y ADN que codifica otros tipos de proteínas, tales como anticuerpos.

El término “tipo silvestre” se refiere a la secuencia de polinucleótidos de origen natural que codifica una proteína, o una porción de esta, o secuencia de proteína, o porción de esta, respectivamente, como existe normalmente in vivo en un sujeto normal o sano.

El término “variante” se refiere a una proteína o ácido nucleico que tiene uno o más cambios genéticos (*por ejemplo*, inserciones, deleciones, sustituciones, o similares) que devuelve todas o sustancialmente todas las funciones de la proteína de referencia o ácido nucleico. Por ejemplo, una variante de una proteína terapéutica retiene la misma o sustancialmente la misma actividad y/o proporciona el mismo o sustancialmente el mismo beneficio terapéutico a un sujeto que lo necesita. Una variante de una secuencia promotora retiene la capacidad de iniciar la transcripción al mismo nivel o sustancialmente al mismo nivel que el promotor de referencia, y retiene la misma o sustancialmente la misma especificidad de tipo de célula. En modalidades particulares, las variantes de polinucleótidos tienen al menos o alrededor de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de la secuencia con una secuencia de referencia. En modalidades particulares, las variantes de proteína tienen al menos o alrededor de 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de la secuencia con una secuencia de referencia.

El término “sujeto” incluye animales, tales como, *p. ej.*, mamíferos. En algunas modalidades, el mamífero es un primate. En algunas modalidades, el mamífero es un ser humano. En algunas modalidades, los sujetos son ganado tal como ganado, oveja, cabras, vacas, cerdos, y similares; o animales domésticos, como perros y gatos. En algunas modalidades (*p. ej.*, particularmente en contextos de investigación) los sujetos son roedores (*p. ej.*, ratones, ratas, hámsteres), conejos, primates, o cerdos tales como cerdos endogámicos y similares. Los términos “sujeto” y “paciente” se usan indistintamente en la presente descripción.

El término “administrar” a un sujeto es un procedimiento mediante el cual uno o más agentes de suministro, juntos o por separado, se introducen o aplican a un sujeto de manera que las células diana que están presentes en el sujeto eventualmente se ponen en contacto con el agente.

“Tratamiento” como se usa en la presente descripción se refiere a administrar un agente o composición a un sujeto para afectar un resultado fisiológico.

Como se usa en la presente descripción, el término “producto génico” se refiere a una proteína o ácido nucleico producido por la transcripción de un polinucleótido y, en el caso de un producto génico proteico, la traducción posterior de la transcripción en una proteína. Un “producto génico terapéutico” se refiere a un producto génico que proporciona un efecto o beneficio fisiológico terapéutico a un sujeto que lo necesita cuando se expresa en una cantidad terapéutica en un sujeto.

Como se usa en la presente descripción, el término “proteína terapéutica” se refiere a una proteína o polipéptido que proporciona un efecto o beneficio fisiológico terapéutico a un sujeto que lo necesita cuando se expresa o administra en una cantidad terapéutica en un sujeto. En algunas modalidades, el tratamiento con una proteína terapéutica o un vector que expresa una proteína terapéutica proporciona un efecto o beneficio fisiológico terapéutico a un sujeto con enfermedad cardíaca (*por ejemplo*, un sujeto con miocardiopatía). Las proteínas terapéuticas ilustrativas para el tratamiento de enfermedades cardíacas se proporcionan en la Tabla 2.

Como se usa en la presente descripción, el término “miocardiopatía” se refiere al deterioro de la función del miocardio (*es decir*, el músculo cardíaco real) por cualquier motivo. Los sujetos con miocardiopatía a menudo corren riesgo de arritmia o muerte cardíaca repentina, o ambos.

Como se usa en la presente descripción, el término “miocardiopatía hipertrófica” se refiere a una enfermedad del corazón y del miocardio en la que una porción del miocardio está hipertrofiada.

Como se usa en la presente descripción, el término “miocardiopatía hipertrófica familiar” se refiere a un trastorno genético caracterizado por un aumento del crecimiento (*es decir*, hipertrofia) en el grosor de la pared del ventrículo izquierdo.

Como se usa en la presente descripción, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad mínima de un agente o composición requerida para resultar en un efecto fisiológico particular. La cantidad eficaz de un agente particular puede representarse de diversas maneras en función de la naturaleza del agente, tal como masa/volumen, cantidad de células/volumen, partículas/volumen, (masa del agente)/(masa del sujeto), cantidad de células/(masa del sujeto), o partículas/(masa del sujeto). La cantidad eficaz de un agente particular también puede expresarse como la concentración eficaz semimáxima (EC_{50}), que se refiere a la concentración de un agente que resulta en una magnitud de una respuesta fisiológica particular que está a mitad de camino entre un nivel de referencia y un nivel de respuesta máximo.

II. Polinucleótidos

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona secuencias de polinucleótidos para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades cardíacas (*por ejemplo*, miocardiopatía). En algunas modalidades, las secuencias de polinucleótidos comprenden un promotor específico cardíaco enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica uno o más productos génicos terapéuticos para el tratamiento y/o la prevención de la miocardiopatía.

Los polinucleótidos se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 100, al menos 200, al menos 300, al menos 400, al menos 500, al menos 1000, al menos 5000, al menos 10000, o al menos 15000 o más nucleótidos de longitud, ya sean ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos o una forma modificada de cualquiera de los tipos de nucleótidos, así como todas las longitudes intermedias. “Longitudes intermedias,” en este contexto, significa cualquier longitud entre los valores mencionados, tales como 6, 7, 8, 9, *etc.*, 101, 102, 103, *etc.*; 151, 152, 153, *etc.*; 201, 202, 203, *etc.*

Como resultado de la degeneración del código genético, hay muchas secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido, o fragmento de variante de este, como se describe en la presente descripción. Algunos de estos polinucleótidos tienen una homología mínima con la secuencia de

nucleótidos de cualquier gen nativo. Sin embargo, los polinucleótidos que varían debido a las diferencias en el uso de codones se contemplan específicamente en modalidades particulares, por ejemplo, polinucleótidos que se optimizan para la selección de codones humanos y/o primates. Además, también pueden usarse alelos de los genes que comprenden las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en la presente descripción. Los alelos son genes endógenos que se alteran como resultado de una o más mutaciones, tales como deleciones, adiciones y/o sustituciones de nucleótidos.

Los polinucleótidos contemplados en la presente descripción, independientemente de la longitud de la secuencia de codificación en sí, pueden combinarse con otras secuencias de ADN, como promotores y/o potenciadores, regiones no traducidas (UTR), secuencias de señales, secuencias Kozak, señales de poliadenilación, sitios enzimáticos de restricción adicionales, múltiples sitios de clonación, sitios de entrada del ribosoma interno (IRES), sitios de reconocimiento de recombinasa (*por ejemplo*, sitios LoxP, FRT, y Att), codones de terminación, señales de terminación transcripcional, y polinucleótidos que codifican polipéptidos autoescindentes, etiquetas de epítomos, como se describe en otra parte de la presente descripción o como se conoce en la técnica.

Los polinucleótidos pueden prepararse, manipularse y/o expresarse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas bien establecidas conocidas y disponibles en la técnica. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos es un promotor. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos es un promotor enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica un producto génico terapéutico para el tratamiento o la prevención de enfermedad cardíaca (*por ejemplo*, miocardiopatía).

En algunas modalidades, el vector comprende un promotor específico cardíaco que se une operativamente a un polinucleótido que codifica un producto génico terapéutico (*p. ej.*, que codifica una proteína terapéutica, *p. ej.*, proteína MYBPC3). Como se usa en la presente descripción, un “promotor específico cardíaco” se refiere a un promotor cuya actividad en células

cardíacas es al menos 2 veces mayor que en cualquier otro tipo de célula no cardíaca. Preferentemente, un promotor específico cardíaco adecuado para usarse en el vector de la invención tiene una actividad en células cardíacas que es al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, o al menos 50 veces mayor en comparación con su actividad en un tipo de célula no cardíaca.

En algunas modalidades, el vector comprende un promotor específico de cardiomiocitos que se une operativamente a un polinucleótido que codifica un producto génico terapéutico (*p. ej.*, proteína MYBPC3). Un “promotor específico de cardiomiocitos”, como se usa en la presente descripción, especifica un promotor cuya actividad en los cardiomiocitos es al menos 2 veces mayor que en cualquier otro tipo de célula no cardíaca o célula cardíaca que no es un cardiomiocito. Preferentemente, un promotor específico de cardiomiocitos adecuado para usarse en el vector de la presente descripción tiene una actividad en cardiomiocitos que es al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces, al menos 25 veces, o al menos 50 veces mayor en comparación con su actividad en un tipo de célula no cardíaca o un tipo de célula cardíaca que no es un cardiomiocito.

En algunas modalidades, el promotor específico cardíaco o específico de cardiomiocitos es un promotor humano. Los ejemplos de promotores específicos cardíacos o de cardiomiocitos incluyen, de modo no taxativo, el promotor de cadena pesada de miosina alfa, el promotor de cadena ligera de miosina 2v, el promotor de cadena pesada de miosina alfa, el promotor de actina alfa-cardíaca, el promotor de alfa-tropomiosina, el promotor de troponina C cardíaca y el promotor de la Ca^{2+} ATPasa del retículo sarco/endoplásmico (SERCA) (*p. ej.*, isoforma 2 de SERCA2).

En algunas modalidades, el promotor específico cardíaco es el promotor de TNNT2 cardíaco. En algunas modalidades, el promotor de TNNT2 cardíaco se modifica, *p. ej.*, por la delección, inserción, o sustitución de polinucleótidos. Las secuencias de polinucleótidos ilustrativas del promotor cardíaco de TNNT2 se muestran en **la Tabla 1** a continuación. El sitio de inicio de la transcripción (TSS) de los promotores de TNNT2 está en negrita y subrayado.

Tabla 1. Promotores ilustrativos de TNNT2

Nombre	Secuencia de ADN	SEQ ID NO.
TNNT2p-600	GTCATGGAGAAGACCCACCTTGCAGATGTCCTCACTGGGG CTGGCAGAGCCGGCAACCTGCCTAAGGCTGCTCAGTCCAT TAGGAGCCAGTAGCCTGGAAGATGTCTTTACCCCCAGCATC AGTTCAAGTGGAGCAGCACATAACTCTTGCCCTCTGCCTTC CAAGATTCTGGTGCTGAGACTTATGGAGTGTCTTGGAGGTT GCCTTCTGCCCCCAACCCTGCTCCAGCTGGCCCTCCCA GGCCTGGGTTGCTGGCCTCTGCTTTATCAGGATTCTCAAGA GGGACAGCTGGTTTATGTTGCATGACTGTTCCCTGCATATC TGCTCTGGTTTTAAATAGCTTATCTGAGCAGCTGGAGGACC ACATGGGCTTATATGGCGTGGGGTACATGTTCCCTGTAGCCT TGTCCTGGCACCTGCCAAAATAGCAGCCAACACCCCCCAC CCCCACCGCCATCCCCCTGCCCCACCCGTCCCCTGTGCA CATTCCCTCCCTCCGCAGGGCTGGCTCACCAGGCCCCAGCC CACATGCCTGCTTAAAGCCCT <u>CTCCATC</u> CTCTGCCTCACCC AGTCCCCGCTGAGACTGAGCAGACGCCTCCA	1
TNNT2p-500	GATGTCTTTACCCCCAGCATCAGTTCAAGTGGAGCAGCACA TAACTCTTGCCCTCTGCCTTCCAAGATTCTGGTGCTGAGACT TATGGAGTGTCTTGGAGGTTGCCTTCTGCCCCCAACCCTG CTCCCAGCTGGCCCTCCCAGGCCTGGGTTGCTGGCCTCTG CTTTATCAGGATTCTCAAGAGGGACAGCTGGTTTATGTTGCA	2

	TGACTGTTCCCTGCATATCTGCTCTGGTTTTAAATAGCTTAT CTGAGCAGCTGGAGGACCACATGGGCTTATATGGCGTGGG GTACATGTTCCCTGTAGCCTTGTCCCTGGCACCTGCCAAAAT AGCAGCCAACACCCCCCACCCCCACCGCCATCCCCCTGCC CCACCCGTCCCCTGTGCGACATTCTCCCTCCGCAGGGCT GGCTCACCAGGCCCCAGCCCACATGCCTGCTTAAAGCCCT <u>CTCCATC</u> CTCTGCCTCACCCAGTCCCCGCTGAGACTGAGCA GACGCCTCCA	
TNNT2p-400	GTTGCCTTCTGCCCCCAACCCTGCTCCCAGCTGGCCCTCC CAGGCCTGGGTTGCTGGCCTCTGCTTTATCAGGATTCTCAA GAGGGACAGCTGGTTTATGTTGCATGACTGTTCCCTGCATA TCTGCTCTGGTTTTAAATAGCTTATCTGAGCAGCTGGAGGA CCACATGGGCTTATATGGCGTGGGGTACATGTTCCCTGTAGC CTTGTCCCTGGCACCTGCCAAAATAGCAGCCAACACCCCCC ACCCCCACCGCCATCCCCCTGCCCCACCCGTCCCCTGTGCG CACATTCTCCCTCCGCAGGGCTGGCTCACCAGGCCCCAG CCCACATGCCTGCTTAAAGCCCT <u>CTCCATC</u> CTCTGCCTCAC CCAGTCCCCGCTGAGACTGAGCAGACGCCTCCA	3
TNNT2p-300	GTTGCATGACTGTTCCCTGCATATCTGCTCTGGTTTTAAATA GCTTATCTGAGCAGCTGGAGGACCACATGGGCTTATATGGC GTGGGGTACATGTTCCCTGTAGCCTTGTCCCTGGCACCTGCC AAAATAGCAGCCAACACCCCCCACCCCCACCGCCATCCCC CTGCCCCACCCGTCCCCTGTGCGACATTCTCCCTCCGCAG GGCTGGCTCACCAGGCCCCAGCCCACATGCCTGCTTAAAG	4

	CCCT <u>CTCCATC</u> CCTCTGCCTCACCCAGTCCCCGCTGAGACTG AGCAGACGCCTCCA	
--	---	--

En algunas modalidades, el promotor cardíaco de TNNT2 se modifica para comprender una secuencia de polinucleótidos de entre aproximadamente 200 y 500 pares de bases, entre aproximadamente 250 y 500 pares de bases, entre aproximadamente 300 a 500 pares de bases, entre aproximadamente 350 a 500 pares de bases, entre aproximadamente 400 a 500 pares de bases, entre aproximadamente 450 a 500 pares de bases, entre aproximadamente 200 y 450 pares de bases, entre aproximadamente 200 y 400 pares de bases, entre aproximadamente 200 y 350 pares de bases, entre aproximadamente 200 y 300 pares de bases, y entre aproximadamente 200 y 250 pares de bases de longitud. En algunas modalidades, el promotor cardíaco de TNNT2 modificado comprende una secuencia de polinucleótidos de entre aproximadamente 350 pares de bases a aproximadamente 450 pares de bases, entre aproximadamente 375 pares de bases a aproximadamente 425 pares de bases, entre aproximadamente 375 pares de bases a aproximadamente 400 pares de bases, entre aproximadamente 375 pares de bases a aproximadamente 425 pares de bases, entre aproximadamente 400 pares de bases a aproximadamente 425 pares de bases, o entre aproximadamente 400 pares de bases a aproximadamente 450 pares de bases. En algunas modalidades, el promotor de TNNT2 cardíaco comprende una secuencia de polinucleótidos de aproximadamente 400 pares de bases.

En una modalidad particular, el promotor de troponina T cardíaca modificada comprende entre 300 pb y 500 pb de la SEQ ID NO 1. Por ejemplo, el promotor de troponina T cardíaca modificada puede comprender la SEQ ID NO 3. En algunos ejemplos, la secuencia de 300 pb-500 pb puede estar enlazada a secuencias de polinucleótidos adicionales, pero puede no estar enlazada a secuencias adicionales derivadas de la SEQ ID NO 1. Por ejemplo, en una modalidad, el promotor

de troponina T cardíaca modificada puede incluir no más de 500 pb de la SEQ ID NO 1 pero puede incluir secuencias de polinucleótidos no relacionadas adicionales. En otro ejemplo, el promotor de troponina T cardíaca modificada puede incluir la SEQ ID NO 3, no hay secuencias adicionales derivadas de la SEQ ID NO 1, pero puede incluir secuencias de polinucleótidos no relacionadas adicionales.

En algunas modalidades, el promotor de TNNT2 cardíaco se modifica mediante la delección de polinucleótidos. Una modificación puede incluir una, dos, tres o más delecciones internas. Cada delección puede ser una delección de 1 par de bases, 2 pares de bases, 3 pares de bases, 4 pares de bases, 5 pares de bases, 10 pares de bases, 15 pares de bases, 20 pares de bases, 25 pares de bases, 30 pares de bases, 40 pares de bases, 50 pares de bases, 60 pares de bases, 70 pares de bases, 80 pares de bases, 90 pares de bases, 100 pares de bases, 125 pares de bases, 150 pares de bases, 175 pares de bases, 200 pares de bases, 225 pares de bases, 250 pares de bases, 275 pares de bases o 300 pares de bases con respecto a un promotor TNNT2 cardíaco de referencia (SEQ ID NO 1) que tiene aproximadamente 600 pares de bases.

En algunas modalidades, el promotor de TNNT2 se modifica mediante la delección de polinucleótidos del extremo corriente arriba del promotor con respecto a un promotor de referencia de TNNT2 cardíaco (SEQ ID NO 1) que tiene aproximadamente 600 pares de bases. Una modificación puede incluir la delección de 1 par de bases, 2 pares de bases, 3 pares de bases, 4 pares de bases, 5 pares de bases, 10 pares de bases, 15 pares de bases, 20 pares de bases, 25 pares de bases, 30 pares de bases, 40 pares de bases, 50 pares de bases, 60 pares de bases, 70 pares de bases, 80 pares de bases, 90 pares de bases, 100 pares de bases, 125 pares de bases, 150 pares de bases, 175 pares de bases, 200 pares de bases, 225 pares de bases, 250 pares de bases, 275 pares de bases o 300 pares de bases del extremo corriente arriba del promotor con respecto a un promotor TNNT2 cardíaco de referencia (SEQ ID NO 1) que tiene aproximadamente 600 pares de bases. En algunas modalidades, la modificación es una delección

de 200 pares de bases del extremo corriente arriba del promotor con respecto a un promotor de referencia de TNNT2 cardíaco (SEQ ID NO 1) que tiene aproximadamente 600 pares de bases.

En algunas modalidades, el promotor de TNNT2 cardíaco se modifica mediante la delección de polinucleótidos del extremo corriente abajo del promotor con respecto a un promotor de referencia

5 de TNNT2 cardíaco (SEQ ID NO 1) que tiene aproximadamente 600 pares de bases. Una modificación puede incluir la delección de 1 par de bases, 2 pares de bases, 3 pares de bases, 4 pares de bases, 5 pares de bases, 10 pares de bases, 15 pares de bases, 20 pares de bases, 25 pares de bases, 30 pares de bases, 40 pares de bases, 50 pares de bases, 60 pares de bases, 70 pares de bases, 80 pares de bases, 90 pares de bases, 100 pares de bases, 125 pares de bases, 150 pares de bases, 175 pares de bases, 200 pares de bases, 225 pares de bases, 250 pares de bases, 275 pares de bases o 300 pares de bases del extremo corriente abajo del promotor con respecto a un promotor TNNT2 cardíaco de referencia (SEQ ID NO 1) que tiene aproximadamente 600 pares de bases.

En algunas modalidades, el promotor de TNNT2 cardíaco se modifica mediante una delección

15 interna de polinucleótidos. Una modificación puede incluir la delección interna de 1 par de bases, 2 pares de bases, 3 pares de bases, 4 pares de bases, 5 pares de bases, 10 pares de bases, 15 pares de bases, 20 pares de bases, 30 pares de bases, 40 pares de bases, 50 pares de bases, 60 pares de bases, 70 pares de bases, 80 pares de bases, 90 pares de bases, 100 pares de bases, 125 pares de bases, 150 pares de bases, 175 pares de bases, 200 pares de bases, 225 pares de bases, 250 pares de bases, 275 pares de bases o 300 pares de bases con respecto a un promotor TNNT2 cardíaco de referencia (SEQ ID NO 1).

En algunas modalidades, el promotor de TNNT2 cardíaco se modifica mediante la inserción de polinucleótidos. Una modificación puede incluir la inserción de 1 par de bases, 2 pares de bases,

3 pares de bases, 4 pares de bases, 5 pares de bases, 10 pares de bases, 15 pares de bases, 20 pares de bases, 25 pares de bases, 30 pares de bases, 35 pares de bases, 40 pares de bases, 45 pares de bases, 50 pares de bases, 55 pares de bases, 60 pares de bases, 65 pares de bases,

70 pares de bases, 75 pares de bases, 80 pares de bases, 85 pares de bases, 90 pares de bases, 100 pares de bases, 125 pares de bases, 150 pares de bases, 175 pares de bases, 200 pares de bases, 225 pares de bases, 250 pares de bases, 275 pares de bases o 300 pares de bases con respecto a un promotor TNNT2 cardíaco de referencia (SEQ ID NO 1).

- 5 En algunas modalidades, el promotor de TNNT2 cardíaco se modifica mediante la sustitución de polinucleótidos. Una modificación puede incluir la sustitución de 1 par de bases, 2 pares de bases, 3 pares de bases, 4 pares de bases, 5 pares de bases, 6 pares de bases, 7 pares de bases, 8 pares de bases, 9 pares de bases o 10 pares de bases con respecto a un promotor TNNT2 cardíaco de referencia (SEQ ID NO 1).
- 10 En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos del promotor de TNNT2 comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos -450 pares de bases a +1 pares de bases en relación con el sitio de inicio de la transcripción del gen TNNT2 humano. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos del promotor de TNNT2 comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos -350 pares de bases a +1 pares de bases en relación con el sitio de inicio de la transcripción del gen TNNT2 humano. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos del promotor de TNNT2 comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos -250 pares de bases a +1 pares de bases en relación con el sitio de inicio de la transcripción del gen TNNT2 humano.
- 20 En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos del promotor de TNNT2 cardíaco comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos -450 pares de bases a +50 pares de bases en relación con el sitio de inicio de la transcripción del gen TNNT2. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos del promotor de TNNT2 cardíaco comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de
- 25

polinucleótidos -350 pares de bases a +50 pares de bases en relación con el sitio de inicio de la transcripción del gen TNNT2. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos del promotor de TNNT2 cardíaco comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o y 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de polinucleótidos -250 pares de bases a +5

5 pares de bases en relación con el sitio de inicio de la transcripción del gen TNNT2.

En algunas modalidades, el promotor de TNNT2 cardíaco comprende una secuencia polinucleotídica que comprende una secuencia que comparte al menos 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o y 100 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO 1-85. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que comparte al menos 80 % de

10 identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO 1-85. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que comparte al menos 90 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO 1-85. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que comparte al menos 100 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO 1-85. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que comparte al menos 80 % de

15 identidad con la SEQ ID NO 1. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que comparte al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO 1. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que comparte al menos 100 % de identidad con la SEQ ID NO 1. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que comparte al menos 80 % de identidad con la SEQ ID NO 3. En algunas

20 modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que comparte al menos 90 % de identidad con la SEQ ID NO 3. En algunas modalidades, el polinucleótido comprende una secuencia que comparte al menos 100 % de identidad con la SEQ ID NO 3.

B. Productos genéticos ilustrativos (proteínas)

Los promotores de la descripción pueden enlazarse operativamente a un polinucleótido que

25 comprende una secuencia que codifica un producto génico (*por ejemplo*, proteína o ácido nucleico). En algunas modalidades, el producto génico es una proteína terapéutica. La proteína

terapéutica puede ser cualquiera de las proteínas humanas nativas enumeradas en la Tabla 2, o homólogos funcionales o variantes de estos. Los promotores de la descripción son particularmente adecuados para su uso con genes grandes que de otra manera podrían expresarse a niveles bajos o no expresarse cuando se administran por un vector viral. Una ventaja

5 de algunas modalidades descritas en la presente descripción radica en la capacidad de expresar una proteína terapéutica (particularmente una proteína terapéutica grande) en un vector viral que tiene capacidad de empaque limitada, *p. ej.*, un vector de AAV. Una proteína “grande” es cualquier proteína cuyo tamaño afecta la expresión en un vector seleccionado. Generalmente, las proteínas terapéuticas “grandes” comprenden al menos aproximadamente 1000 o más aminoácidos, es

10 decir, la proteína es codificada por una secuencia de polinucleótidos de aproximadamente 3 kbps o mayor. Las proteínas ilustrativas, que incluyen proteínas grandes, se proporcionan en **la Tabla 2** a continuación.

Tabla 2. Proteínas ilustrativas

Nombre del gen	Símbolo del gen	ID del gen del NCBI	ID de UniProt
Proteína C de unión a miosina	MYBPC3	4607	Q14896
Canal activado por voltaje de potasio, subfamilia H, miembro 2	KCNH2	3757	Q12809
Canal de cationes con potencial de receptores transitorios, subfamilia M miembro 4	TRPM4	54795	Q8TD43
Desmogleína-2	DSG2	1829	Q14126

Nombre del gen	Símbolo del gen	ID del gen del NCBI	ID de UniProt
ATPasa sarcoplásmica/endoplásmica del retículo de calcio transportadora 2	ATP2A2	488	P16615
Canal activado por voltaje de calcio, subunidad alfa 1C	CACNA1C	775	Q13936
Distrofina	DMD	1756	P11532
Proteína cinasa DM1	DMPK	1760	Q09013
Homólogo de proteína 5 de gránulos P ectópicos	EPG5	57724	Q9HCE0
Complejo ciliar EvC, subunidad 1	EVC	2121	P57679
Limbina	EVC2	132884	Q86UK5
Fibrilina-1	FBN1	2200	P35555
Neurofibromina	NF1	4763	P21359
Proteína del canal de sodio tipo 5 subunidad alfa	SCN5A	6331	Q14524
Hijo de homólogo sin siete 1	SOS1	6654	Q07889
Receptor del péptido natriurético 1	NPR1	4881	P16066
Receptor de tirosina-proteína cinasa erbB-4	ERBB4	2066	Q15303
Péptido intestinal vasoactivo	VIP	7432	P01282
Cadena pesada de Beta-miosina	MYH7	4625	P12883

Varios polinucleótidos terapéuticos, o proteínas terapéuticas codificadas por polinucleótidos, que tienen longitudes de 3 kilobases o mayores se expresan más eficazmente cuando se enlazan operativamente a un promotor de TNNT2 modificado de la descripción en comparación con un promotor de TNNT2 de aproximadamente 600 pares de bases. Los promotores de la descripción son útiles en la expresión de, al menos, lo siguiente: a) genes grandes en los que las mutaciones de pérdida de función resultan en miocardiopatía (terapia de reemplazo de genes); b) genes grandes cuya expresión en cardiomiocitos es cardioprotectora; c) combinaciones de genes cuya coexpresión en cardiomiocitos es beneficiosa; y d) herramientas para la edición del genoma específico de los cardiomiocitos. Un gen “grande” es cualquier gen cuyo tamaño afecta la expresión en un vector seleccionado. Generalmente, los genes terapéuticos “grandes” codifican proteínas que comprenden al menos aproximadamente 1000 o más aminoácidos, es decir, el gen comprende una secuencia de polinucleótidos de aproximadamente 3 kbps o mayor. En modalidades adicionales, los vectores y promotores de la descripción se usan en el tratamiento de enfermedades o trastornos enumerados en la **Tabla 3**, donde el polinucleótido codifica la proteína terapéutica indicada en la tabla.

Tabla 3. Productos génicos terapéuticos ilustrativos para enfermedades cardíacas

Afección	Producto génico terapéutico	Tamaño del gen (kb)
Síndrome de Timothy	CACNA1C	6.663
Distrofia muscular de Becker	DMD	11.055
Distrofia muscular de Duchenne	DMD	11.055
Distrofia miotónica de tipo 1	DMPK	4.653
Síndrome de Vici	EPG5	7.737
Síndrome de Ellis-Van Creveld	EVC	2.976
Síndrome de Ellis-Van Creveld	EVC2	3.924

Síndrome de Marfan	FBN1	8.613
Síndrome de QT largo	KCNH2	3.477
Neurofibromatosis Síndrome de Noonan	NF1	3.517
Síndrome de Brugada	SCN5A	6.048
Síndrome de QT largo	SCN5A	6.048
Fibrilación ventricular paroxística 1	SCN5A	6.048
Bloqueo cardíaco familiar progresivo de tipo 1A	SCN5A	6.048
Síndrome de Noonan	SOS1	3.999
Bloqueo cardíaco familiar progresivo de tipo 1B	TRPM4	3.642
Insuficiencia cardíaca descompensada aguda (ADHF)	NPR1	3.183
Insuficiencia cardíaca congestiva (CHF)	ERBB4	3.924
Insuficiencia cardíaca congestiva (CHF)	Análogo VIP*	3.729
Miocardiopatía hipertrófica	MYBPC3	3.822
Miocardiopatía no compresiva ventricular izquierda	MYBPC3	3.822
Miocardiopatía hipertrófica	MYH7	5.805
Miocardiopatía no compresiva ventricular izquierda	MYH7	5.805

*VIP fusionado a un biopolímero ELP (*p. ej.*, PB1046) para aumentar la estabilidad in vivo

MYBPC3 es un gen que se expresa en las células cardíacas. Se sabe que varias mutaciones en *MYBPC3* causan miocardiopatía hipertrófica. Casi la mitad de todas las mutaciones causantes de la miocardiopatía hipertrófica provocan truncamientos, a través de mutaciones sin sentido, de desplazamiento del marco de lectura o de sitio de empalme (Marian y Braunwald, Circ. Res. 121:749-770 (2017); Walsh et al., Genet. Med. 19:192-203 (2017)). Los ARNm que contienen codones de terminación prematura están sujetos a vigilancia y degradación por parte de maquinaria de desintegración mediada por el sistema sin sentido. Esto coincide con la

disminución de los niveles de ARN mutantes en el análisis del tejido cardíaco de pacientes con miocardiopatía hipertrófica que han recibido miectomías (Marston et al., Circ. Res. 105:219-222 (2009); van Dijk et al., Circulation 119:1473-1483 (2009); Helms et al., Circ. Cardiovasc. Genet. 7:434-443 (2014). Además, cualquier polipéptido truncado resultante parece sensible al sistema

5 de degradación de ubiquitina-proteasoma. En las muestras de miectomía de pacientes, no se observó proteína truncada para nueve mutaciones distintas (Rottbauer et al., J. Clin. Invest. 100:475-482 (1997); Moolman et al., Circulation 101:1396-1402 (2000); Marston et al., Circ. Res. 105:219-222 (2009); van Dijk et al., Heart Fail 5:36-46 (2012)). Aunque parece que el alelo de tipo silvestre *MYBPC3* en pacientes heterocigotos está ligeramente regulado por aumento, la

10 cantidad total de proteína MYBPC3 incorporada en los sarcómeros cae significativamente por debajo de lo normal en ~65 % (Marston et al., Circ. Res. 105:219-222 (2009); van Dijk et al., Circ. Heart Fail 5:36-46 (2012); McNamara et al., PLoS One 12:e0180064 (2017)). Por lo tanto, la fisiopatología sarcómera de los pacientes con miocardiopatía hipertrófica con mutaciones truncadas *MYBPC3* parece deberse a la haploinsuficiencia.

15 En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína MYBPC3, enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 cardíaco modificado) es *MYBPC3*, o mutante, variante o fragmento de este.

20 En los seres humanos, el gen *MYBPC3* codifica la proteína MYBPC3 (también conocida como MyBP-C), que regula el sarcómero cardíaco, la unidad básica de la contracción muscular. El sarcómero del músculo cardíaco consta de filamentos gruesos y finos, y MYBPC3 se une a los filamentos gruesos para evitar una degradación prematura. Las secuencias ilustrativas de polinucleótidos MYBPC3 se muestran en la **Tabla 4A** a continuación. En algunas modalidades,

25 el polinucleótido que codifica MYBPC3 comparte al menos 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO 86-89. Las secuencias ilustrativas de proteínas

MYBPC3 se muestran en la **Tabla 4B**. En algunas modalidades, el genoma del vector codifica una proteína MYBPC3 que comparte al menos 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO 103-106.

5

Tabla 4A. Secuencias de polinucleótidos MYBPC3 ilustrativas

Nombre	Secuencia de ADN	SEQ ID NO.
MYBPC3	ATGCCTGAGCCGGGGAAGAAGCCAGTCTCAGCTTTTAGCAAGAAGC CACGGTCAGTGGAAGTGGCCGCAGGCAGCCCTGCCGTGTTGAGG CCGAGACAGAGCGGGCAGGAGTGAAGGTGCGCTGGCAGCGCGGA GGCAGTGACATCAGCGCCAGCAACAAGTACGGCCTGGCCACAGAG GGCACACGGCATACTGACAGTGCGGGAAGTGGGCCCTGCCGAC CAGGGATCTTACGCAGTCATTGCTGGCTCCTCCAAGGTCAAGTTCG ACCTCAAGGTCATAGAGGCAGAGAAGGCAGAGCCCATGCTGGCCC CTGCCCCCTGCCCCCTGCTGAGGCCACTGGAGCCCCTGGAGAAGCCC CGGCCCCAGCCGCTGAGCTGGGAGAAAGTGCCCCAAGTCCCAAAG GGTCAAGCTCAGCAGCTCTCAATGGTCCTACCCCTGGAGCCCCCGA TGACCCCATTTGGCCTCTTCGTGATGCGGCCACAGGATGGCGAGGT GACCGTGGGTGGCAGCATCACCTTCTCAGCCCGCGTGGCCGGCGC CAGCCTCCTGAAGCCGCCTGTGGTCAAGTGGTTCAAGGGCAAATGG GTGGACCTGAGCAGCAAGGTGGGCCAGCACCTGCAGCTGCACGAC AGCTACGACCGCGCCAGCAAGGTCTATCTGTTGAGCTGCACATCA CCGATGCCAGCCTGCCTTCACTGGCAGCTACCGCTGTGAGGTGTC CACCAAGGACAAATTTGACTGCTCCAACTTCAATCTCACTGTCCACG	86

AGGCCATGGGCACCGGAGACCTGGACCTCCTATCAGCCTTCCGCC GCACGAGCCTGGCTGGAGGTGGTCGGCGGATCAGTGATAGCCATG AGGACACTGGGATTCTGGACTTCAGCTCACTGCTGAAAAAGAGAGA CAGTTTCCGGACCCCGAGGGACTCGAAGCTGGAGGCACCAGCAGA GGAGGACGTGTGGGAGATCCTACGGCAGGCACCCCCATCTGAGTA CGAGCGCATCGCCTTCCAGTACGGCGTCACTGACCTGCGCGGCAT GCTAAAGAGGCTCAAGGGCATGAGGCGCGATGAGAAGAAGAGCAC AGCCTTTCAGAAGAAGCTGGAGCCGGCCTACCAGGTGAGCAAAGG CCACAAGATCCGGCTGACCGTGGAAGTGGCTGACCATGACGCTGA GGTCAAATGGCTCAAGAATGGCCAGGAGATCCAGATGAGCGGCAG CAAGTACATCTTTGAGTCCATCGGTGCCAAGCGTACCCTGACCATCA GCCAGTGCTCATTGGCGGACGACGCAGCCTACCAGTGCGTGGTGG GTGGCGAGAAGTGTAGCACGGAGCTCTTTGTGAAAGAGCCCCCTGT GCTCATCACGCGCCCCTTGGAGGACCAGCTGGTGATGGTGGGGCA GCGGGTGGAGTTTGAGTGTGAAGTATCGGAGGAGGGGGCGCAAGT CAAATGGCTGAAGGACGGGGTGGAGCTGACCCGGGAGGAGACCTT CAAATACCGGTTCAAGAAGGACGGGCAGAGACACCACCTGATCATC AACGAGGCCATGCTGGAGGACGCGGGGCACTATGCACTGTGCACT AGCGGGGGCCAGGCGCTGGCTGAGCTCATTGTGCAGGAAAAGAAG CTGGAGGTGTACCAGAGCATCGCAGACCTGATGGTGGGCGCAAAG GACCAGGCGGTGTTCAAATGTGAGGTCTCAGATGAGAATGTTCGGG GTGTGTGGCTGAAGAATGGGAAGGAGCTGGTGCCCGACAGCCGCA TAAAGGTGTCCACATCGGGCGGGTCCACAACTGACCATTGACGA CGTCACACCTGCCGACGAGGCTGACTACAGCTTTGTGCCCGAGGG CTTCGCCTGCAACCTGTCAGCCAAGCTCCACTTCATGGAGGTCAAG	
---	--

ATTGACTTCGTACCCAGGCAGGAACCTCCCAAGATCCACCTGGACT GCCCAGGCCGCATACCAGACACCATTGTGGTTGTAGCTGGAAATAA GCTACGTCTGGACGTCCCTATCTCTGGGGACCCCGCTCCCACTGTG ATCTGGCAGAAGGCTATCACGCAGGGGAATAAGGCCCCAGCCAGG CCAGCCCCAGATGCCCCAGAGGACACAGGTGACAGCGATGAGTGG GTGTTTGACAAGAAGCTGCTGTGTGAGACCGAGGGCCGGGTCCGC GTGGAGACCACCAAGGACCGCAGCATCTTCACGGTCGAGGGGGCA GAGAAGGAAGATGAGGGCGTCTACACGGTCACAGTGAAGAACCCT GTGGGCGAGGACCAGGTCAACCTCACAGTCAAGGTCATCGACGTG CCAGACGCACCTGCGGCCCCCAAGATCAGCAACGTGGGAGAGGAC TCCTGCACAGTACAGTGGGAGCCGCCTGCCTACGATGGCGGGCAG CCCATCCTGGGCTACATCCTGGAGCGCAAGAAGAAGAAGAGCTACC GGTGGATGCGGCTGAACTTCGACCTGATTCAGGAGCTGAGTCATGA AGCGCGGCGCATGATCGAGGGCGTGGTGTACGAGATGCGCGTCTA CGCGGTCAACGCCATCGGCATGTCCAGGCCCAGCCCTGCCTCCCA GCCCTTCATGCCTATCGGTCCCCCAGCGAACCACCCACCTGGCA GTAGAGGACGTCTCTGACACCACGGTCTCCCTCAAGTGGCGGGCC CCAGAGCGCGTGGGAGCAGGAGGCCTGGATGGCTACAGCGTGGA GTACTGCCCAGAGGGCTGCTCAGAGTGGGTGGCTGCCCTGCAGGG GCTGACAGAGCACACATCGATACTGGTGAAGGACCTGCCCACGGG GGCCCCGGCTGCTTTTCCGAGTGCGGGCACACAATATGGCAGGGCC TGGAGCCCCTGTTACCACCACGGAGCCGGTGACAGTGCAGGAGAT CCTGCAACGGCCACGGCTTCAGCTGCCCAGGCACCTGCGCCAGAC CATTGAGAAGAAGGTCGGGGAGCCTGTGAACCTTCTCATCCCTTTC CAGGGCAAGCCCCGGCCTCAGGTGACCTGGACCAAAGAGGGGCAG	
---	--

	CCCCTGGCAGGCGAGGAGGTGAGCATCCGCAACAGCCCCACAGAC ACCATCCTGTTCATCCGGGCGCTCGCCGCGTGCAATCAGGCACTT ACCAGGTGACGGTGCGCATTGAGAACATGGAGGACAAGGCCACGC TGGTGCTGCAGGTTGTTGACAAGCCAAGTCCTCCCCAGGATCTCCG GGTGACTGACGCCTGGGGTCTTAATGTGGCTCTGGAGTGGAAGCCA CCCAGGATGTCGGCAACACGGAACCTCTGGGGGTACACAGTGCAG AAAGCCGACAAGAAGACCATGGAGTGGTTCACCGTCTTGGAGCATT ACCGCCGCACCCACTGCGTGGTGCCAGAGCTCATCATTGGCAATGG CTACTACTTCCGCGTCTTCAGCCAGAATATGGTTGGCTTTAGTGACA GAGCGGCCACCACCAAGGAGCCCGTCTTTATCCCCAGACCAGGCAT CACCTATGAGCCACCCAACCTATAAGGCCCTGGACTTCTCCGAGGCC CCAAGCTTCACCCAGCCCCTGGTGAACCGCTCGGTCATCGCGGGC TACTGCTATGCTCTGCTGTGCTGTCCGGGGTAGCCCCAAGCCCA AGATTTCTGTTCAAGAATGGCCTGGACCTGGGAGAAGACGCCCCG CTTCCGCATGTTGAGCAAGCAGGGAGTGTTGACTCTGGAGATTAGA AAGCCCTGCCCCTTTGACGGGGGCATCTATGTCTGCAGGGCCACCA ACTTACAGGGCGAGGCACGGTGTGAGTGCCGCCTGGAGGTGCGAG TGCCTCAGTAA	
MYBPC3- delC3	ATGCCTGAGCCGGGGAAGAAGCCAGTCTCAGCTTTTAGCAAGAAGC CACGGTCAGTGGAAGTGGCCGCAGGCAGCCCTGCCGTGTTGAGG CCGAGACAGAGCGGGCAGGAGTGAAGGTGCGCTGGCAGCGCGGA GGCAGTGACATCAGCGCCAGCAACAAGTACGGCCTGGCCACAGAG GGCACACGGCATACGCTGACAGTGCGGGAAGTGGGCCCTGCCGAC CAGGGATCTTACGCAGTCATTGCTGGCTCCTCCAAGGTCAAGTTG	87

ACCTCAAGGTCATAGAGGCAGAGAAGGCAGAGCCCATGCTGGCCC CTGCCCCCTGCCCCTGCTGAGGCCACTGGAGCCCCTGGAGAAGCCC CGGCCCCAGCCGCTGAGCTGGGAGAAAGTGCCCCAAGTCCCAAAG GGTCAAGCTCAGCAGCTCTCAATGGTCCTACCCCTGGAGCCCCCGA TGACCCCATTTGGCCTCTTCGTGATGCGGCCACAGGATGGCGAGGT GACCGTGGGTGGCAGCATCACCTTCTCAGCCCGCGTGGCCGGCGC CAGCCTCCTGAAGCCGCCTGTGGTCAAGTGGTTCAAGGGCAAATGG GTGGACCTGAGCAGCAAGGTGGGCCAGCACCTGCAGCTGCACGAC AGCTACGACCGCGCCAGCAAGGTCTATCTGTTGAGCTGCACATCA CCGATGCCCAGCCTGCCTTCACTGGCAGCTACCGCTGTGAGGTGTC CACCAAGGACAAATTTGACTGCTCCAACTTCAATCTCACTGTCCACG AGGCCATGGGCACCGGAGACCTGGACCTCCTATCAGCCTTCCGCC GCACGAGCCTGGCTGGAGGTGGTCGGCGGATCAGTGATAGCCATG AGGACACTGGGATTCTGGACTTCAGCTCACTGCTGAAAAAGAGAGA CAGTTTCCGGACCCCGAGGGACTCGAAGCTGGAGGCACCAGCAGA GGAGGACGTGTGGGAGATCCTACGGCAGGCACCCCCATCTGAGTA CGAGCGCATCGCCTTCCAGTACGGCGTCACTGACCTGCGCGGCAT GCTAAAGAGGCTCAAGGGCATGAGGCGCGATGAGAAGAAGAGCAC AGCCTTTCAGAAGAAGCTGGAGCCGGCCTACCAGGTGAGCAAAGG CCACAAGATCCGGCTGACCGTGGAAGTGGCTGACCATGACGCTGA GGTCAAATGGCTCAAGAATGGCCAGGAGATCCAGATGAGCGGCAG CAAGTACATCTTTGAGTCCATCGGTGCCAAGCGTACCCTGACCATCA GCCAGTGCTCATTGGCGGACGACGCAGCCTACCAGTGCGTGGTGG GTGGCGAGAAGTGTAGCACGGAGCTCTTTGTGAAAGAGCCCCCTGT GTACCAGAGCATCGCAGACCTGATGGTGGGCGCAAAGGACCAGGC	
--	--

GGTGTTCAAATGTGAGGTCTCAGATGAGAATGTTCTGGGGTGTGTGG CTGAAGAATGGGAAGGAGCTGGTGCCCGACAGCCGCATAAAGGTG TCCCACATCGGGCGGGTCCACAACTGACCATTGACGACGTCACAC CTGCCGACGAGGCTGACTACAGCTTTGTGCCCGAGGGCTTCGCCT GCAACCTGTCAGCCAAGCTCCACTTCATGGAGGTCAAGATTGACTT CGTACCCAGGCAGGAACCTCCCAAGATCCACCTGGACTGCCCAGG CCGCATACCAGACACCATTGTGGTTGTAGCTGGAAATAAGCTACGT CTGGACGTCCCTATCTCTGGGGACCCCGCTCCCACTGTGATCTGGC AGAAGGCTATCACGCAGGGGAATAAGGCCCCAGCCAGGCCAGCCC CAGATGCCCCAGAGGACACAGGTGACAGCGATGAGTGGGTGTTTG ACAAGAAGCTGCTGTGTGAGACCGAGGGCCGGGTCCGCGTGGAGA CCACCAAGGACCGCAGCATCTTCACGGTCGAGGGGGGCAGAGAAGG AAGATGAGGGCGTCTACACGGTCACAGTGAAGAACCCTGTGGGCG AGGACCAGGTCAACCTCACAGTCAAGGTCATCGACGTGCCAGACGC ACCTGCGGCCCCCAAGATCAGCAACGTGGGAGAGGACTCCTGCAC AGTACAGTGGGAGCCGCCTGCCTACGATGGCGGGCAGCCCATCCT GGGCTACATCCTGGAGCGCAAGAAGAAGAAGAGCTACCGGTGGAT GCGGCTGAACTTCGACCTGATTCAGGAGCTGAGTCATGAAGCGCGG CGCATGATCGAGGGCGTGGTGTACGAGATGCGCGTCTACGCGGTC AACGCCATCGGCATGTCCAGGCCCAGCCCTGCCTCCCAGCCCTTCA TGCCTATCGGTCCCCCAGCGAACCCACCCACCTGGCAGTAGAGG ACGTCTCTGACACCACGGTCTCCCTCAAGTGGCGGGCCCCCAGAGC GCGTGGGAGCAGGAGGCCTGGATGGCTACAGCGTGGAGTACTGCC CAGAGGGCTGCTCAGAGTGGGTGGCTGCCCTGCAGGGGCTGACAG AGCACACATCGATACTGGTGAAGGACCTGCCACGGGGGCCCCGGC	
--	--

TGCTTTTCCGAGTGCGGGCACACAATATGGCAGGGCCTGGAGCCC CTGTTACCACCACGGAGCCGGTGACAGTGCAGGAGATCCTGCAAC GGCCACGGCTTCAGCTGCCCAGGCACCTGCGCCAGACCATTCAGA AGAAGGTCGGGGAGCCTGTGAACCTTCTCATCCCTTTCCAGGGCAA GCCCCGGCCTCAGGTGACCTGGACCAAAGAGGGGCAGCCCCTGGC AGGCGAGGAGGTGAGCATCCGCAACAGCCCCACAGACACCATCCT GTTTCATCCGGGGCCGCTCGCCGCGTGCAATTCAGGCACTTACCAGGTG ACGGTGCGCATTGAGAACATGGAGGACAAGGCCACGCTGGTGCTG CAGGTTGTTGACAAGCCAAGTCCTCCCCAGGATCTCCGGGTGACTG ACGCCTGGGGTCTTAATGTGGCTCTGGAGTGGAAGCCACCCCAGG ATGTCGGCAACACGGAACCTCTGGGGGTACACAGTGCAGAAAGCCG ACAAGAAGACCATGGAGTGGTTCACCGTCTTGGAGCATTACCGCCG CACCCACTGCGTGGTGCCAGAGCTCATCATTGGCAATGGCTACTAC TTCCGCGTCTTCAGCCAGAATATGGTTGGCTTTAGTGACAGAGCGG CCACCACCAAGGAGCCCGTCTTTATCCCCAGACCAGGCATCACCTA TGAGCCACCCAACTATAAGGCCCTGGACTTCTCCGAGGCCCCAAGC TTCACCCAGCCCCTGGTGAACCGCTCGGTTCATCGCGGGCTACACTG CTATGCTCTGCTGTGCTGTCCGGGGTAGCCCCAAGCCCAAGATTTT CTGGTTCAAGAATGGCCTGGACCTGGGAGAAGACGCCCCGCTTCCG CATGTTTCAGCAAGCAGGGAGTGTTGACTCTGGAGATTAGAAAGCCC TGCCCCTTTGACGGGGGCATCTATGTCTGCAGGGCCACCAACTTAC AGGGCGAGGCACGGTGTGAGTGCCGCCTGGAGGTGCGAGTGCCTC AGTAA	
---	--

MYBPC3- delC4	ATGCCTGAGCCGGGGAAGAAGCCAGTCTCAGCTTTTAGCAAGAAGC CACGGTCAGTGGAAGTGGCCGCAGGCAGCCCTGCCGTGTTCGAGG CCGAGACAGAGCGGGCAGGAGTGAAGGTGCGCTGGCAGCGCGGA GGCAGTGACATCAGCGCCAGCAACAAGTACGGCCTGGCCACAGAG GGCACACGGCATACTGCTGACAGTGCGGGAAGTGGGCCCTGCCGAC CAGGGATCTTACGCAGTCATTGCTGGCTCCTCCAAGGTCAAGTTCG ACCTCAAGGTCATAGAGGCAGAGAAGGCAGAGCCCATGCTGGCCC CTGCCCCCTGCCCCCTGCTGAGGCCACTGGAGCCCCTGGAGAAGCCC CGGCCCCAGCCGCTGAGCTGGGAGAAAGTGCCCCAAGTCCCAAAG GGTCAAGCTCAGCAGCTCTCAATGGTCCTACCCCTGGAGCCCCCGA TGACCCCATTTGGCCTCTTCGTGATGCGGCCACAGGATGGCGAGGT GACCGTGGGTGGCAGCATCACCTTCTCAGCCCGCGTGGCCGGCGC CAGCCTCCTGAAGCCGCCTGTGGTCAAGTGGTTCAAGGGCAAATGG GTGGACCTGAGCAGCAAGGTGGGCCAGCACCTGCAGCTGCACGAC AGCTACGACCGCGCCAGCAAGGTCTATCTGTTTCGAGCTGCACATCA CCGATGCCCAGCCTGCCTTCACTGGCAGCTACCGCTGTGAGGTGTC CACCAAGGACAAATTTGACTGCTCCAACTTCAATCTCACTGTCCACG AGGCCATGGGCACCGGAGACCTGGACCTCCTATCAGCCTTCCGCC GCACGAGCCTGGCTGGAGGTGGTCGGCGGATCAGTGATAGCCATG AGGACACTGGGATTCTGGACTTCAGCTCACTGCTGAAAAAGAGAGA CAGTTTCCGGACCCCGAGGGACTCGAAGCTGGAGGCACCAGCAGA GGAGGACGTGTGGGAGATCCTACGGCAGGCACCCCATCTGAGTA CGAGCGCATCGCCTTCCAGTACGGCGTCACTGACCTGCGCGGCAT GCTAAAGAGGCTCAAGGGCATGAGGCGCGATGAGAAGAAGAGCAC AGCCTTTCAGAAGAAGCTGGAGCCGGCCTACCAGGTGAGCAAAGG	88
------------------	---	----

CCACAAGATCCGGCTGACCGTGGAAGTGGCTGACCATGACGCTGA GGTCAAATGGCTCAAGAATGGCCAGGAGATCCAGATGAGCGGCAG CAAGTACATCTTTGAGTCCATCGGTGCCAAGCGTACCCTGACCATCA GCCAGTGCTCATTGGCGGACGACGCAGCCTACCAGTGCGTGGTGG GTGGCGAGAAGTGTAGCACGGAGCTCTTTGTGAAAGAGCCCCCTGT GCTCATCACGCGCCCCTTGGAGGACCAGCTGGTGATGGTGGGGCA GCGGGTGGAGTTTGAGTGTGAAGTATCGGAGGAGGGGGCGCAAGT CAAATGGCTGAAGGACGGGGTGGAGCTGACCCGGGAGGAGACCTT CAAATACCGGTTCAAGAAGGACGGGCAGAGACACCACCTGATCATC AACGAGGCCATGCTGGAGGACGCGGGGCACTATGCACTGTGCACT AGCGGGGGCCAGGCGCTGGCTGAGCTCATTGTGCAGGAAAAGAAG CTGGAGCCTCCCAAGATCCACCTGGACTGCCCAGGCCGCATACCA GACACCATTGTGGTTGTAGCTGGAAATAAGCTACGTCTGGACGTCC CTATCTCTGGGGACCCCGCTCCCACTGTGATCTGGCAGAAGGCTAT CACGCAGGGGAATAAGGCCCCAGCCAGGCCAGCCCCAGATGCCCC AGAGGACACAGGTGACAGCGATGAGTGGGTGTTTGACAAGAAGCTG CTGTGTGAGACCGAGGGCCGGGTCCGCGTGGAGACCACCAAGGAC CGCAGCATCTTCACGGTCGAGGGGGCAGAGAAGGAAGATGAGGGC GTCTACACGGTCACAGTGAAGAACCCTGTGGGCGAGGACCAGGTC AACCTCACAGTCAAGGTCATCGACGTGCCAGACGCACCTGCGGCCC CCAAGATCAGCAACGTGGGAGAGGACTCCTGCACAGTACAGTGGG AGCCGCCTGCCTACGATGGCGGGCAGCCCATCCTGGGCTACATCC TGGAGCGCAAGAAGAAGAAGAGCTACCGGTGGATGCGGCTGAACT TCGACCTGATTGAGGAGCTGAGTCATGAAGCGCGGCGCATGATCGA GGGCGTGGTGTACGAGATGCGCGTCTACGCGGTCAACGCCATCGG	
---	--

	CATGTCCAGGCCCCAGCCCTGCCTCCCAGCCCTTCATGCCTATCGGT CCCCCCAGCGAACCCACCCACCTGGCAGTAGAGGACGTCTCTGAC ACCACGGTCTCCCTCAAGTGGCGGCCCCCAGAGCGCGTGGGAGCA GGAGGCCTGGATGGCTACAGCGTGGAGTACTGCCCAGAGGGCTGC TCAGAGTGGGTGGCTGCCCTGCAGGGGCTGACAGAGCACACATCG AACTGGTGAAGGACCTGCCCACGGGGGCCCGGCTGCTTTTCCGA GTGCGGGCACACAATATGGCAGGGCCTGGAGCCCCTGTTACCACC ACGGAGCCGGTGACAGTGCAGGAGATCCTGCAACGGCCACGGCTT CAGCTGCCCAGGCACCTGCGCCAGACCATTGAGAAGAAGGTCGGG GAGCCTGTGAACCTTCTCATCCCTTTCCAGGGCAAGCCCCGGCCTC AGGTGACCTGGACCAAAGAGGGGCAGCCCCTGGCAGGCGAGGAG GTGAGCATCCGCAACAGCCCCACAGACACCATCCTGTTCATCCGGG CCGCTCGCCGCGTGCAATCAGGCACTTACCAGGTGACGGTGCGCA TTGAGAACATGGAGGACAAGGCCACGCTGGTGCTGCAGGTTGTTGA CAAGCCAAGTCCTCCCCAGGATCTCCGGGTGACTGACGCCTGGGG TCTTAATGTGGCTCTGGAGTGGAAGCCACCCCAGGATGTCGGCAAC ACGGAACTCTGGGGGTACACAGTGCAGAAAGCCGACAAGAAGACC ATGGAGTGGTTCACCGTCTTGGAGCATTACCGCCGCACCCACTGCG TGGTGCCAGAGCTCATCATTGGCAATGGCTACTACTTCCGCGTCTTC AGCCAGAATATGGTTGGCTTTAGTGACAGAGCGGCCACCACCAAGG AGCCCGTCTTTATCCCCAGACCAGGCATCACCTATGAGCCACCCAA CTATAAGGCCCTGGACTTCTCCGAGGCCCCAAGCTTCACCCAGCCC CTGGTGAACCGCTCGGTCATCGCGGGCTACACTGCTATGCTCTGCT GTGCTGTCCGGGGTAGCCCCAAGCCCAAGATTTCTGGTTCAAGAA TGGCCTGGACCTGGGAGAAGACGCCCCGCTTCCGCATGTTCAAGAA	
--	--	--

	GCAGGGAGTGTTGACTCTGGAGATTAGAAAGCCCTGCCCTTTGAC GGGGGCATCTATGTCTGCAGGGGCCACCAACTTACAGGGCGAGGCA CGGTGTGAGTGCCGCCTGGAGGTGCGAGTGCCTCAGTAA	
MYBPC3- delC4b	ATGCCTGAGCCGGGGAAGAAGCCAGTCTCAGCTTTTAGCAAGAAGC CACGGTCAGTGGAAGTGGCCGCAGGCAGCCCTGCCGTGTTCGAGG CCGAGACAGAGCGGGCAGGAGTGAAGGTGCGCTGGCAGCGCGGA GGCAGTGACATCAGCGCCAGCAACAAGTACGGCCTGGCCACAGAG GGCACACGGCATACTGCTGACAGTGCGGGAAGTGGGCCCTGCCGAC CAGGGATCTTACGCAGTCATTGCTGGCTCCTCCAAGGTCAAGTTCG ACCTCAAGGTCATAGAGGCAGAGAAGGCAGAGCCCATGCTGGCCC CTGCCCCCTGCCCTGCTGAGGCCACTGGAGCCCCTGGAGAAGCCC CGGCCCCAGCCGCTGAGCTGGGAGAAAGTGCCCCAAGTCCCAAAG GGTCAAGCTCAGCAGCTCTCAATGGTCCTACCCCTGGAGCCCCCGA TGACCCCATTTGGCCTCTTCGTGATGCGGCCACAGGATGGCGAGGT GACCGTGGGTGGCAGCATCACCTTCTCAGCCCGCGTGGCCGGCGC CAGCCTCCTGAAGCCGCCTGTGGTCAAGTGGTTCAAGGGCAAATGG GTGGACCTGAGCAGCAAGGTGGGCCAGCACCTGCAGCTGCACGAC AGCTACGACCGCGCCAGCAAGGTCTATCTGTTTCGAGCTGCACATCA CCGATGCCCAGCCTGCCTTCACTGGCAGCTACCGCTGTGAGGTGTC CACCAAGGACAAATTTGACTGCTCCAACTTCAATCTCACTGTCCACG AGGCCATGGGCACCGGAGACCTGGACCTCCTATCAGCCTTCCGCC GCACGAGCCTGGCTGGAGGTGGTCGGCGGATCAGTGATAGCCATG AGGACACTGGGATTCTGGACTTCAGCTCACTGCTGAAAAAGAGAGA	89

CAGTTTCCGGACCCCGAGGGACTCGAAGCTGGAGGCACCAGCAGA GGAGGACGTGTGGGAGATCCTACGGCAGGCACCCCATCTGAGTA CGAGCGCATCGCCTTCCAGTACGGCGTCACTGACCTGCGCGGCAT GCTAAAGAGGCTCAAGGGCATGAGGCGCGATGAGAAGAAGAGCAC AGCCTTTCAGAAGAAGCTGGAGCCGGCCTACCAGGTGAGCAAAGG CCACAAGATCCGGCTGACCGTGGAAGTGGCTGACCATGACGCTGA GGTCAAATGGCTCAAGAATGGCCAGGAGATCCAGATGAGCGGCAG CAAGTACATCTTTGAGTCCATCGGTGCCAAGCGTACCCTGACCATCA GCCAGTGCTCATTGGCGGACGACGCAGCCTACCAGTGCGTGGTGG GTGGCGAGAAGTGTAGCACGGAGCTCTTTGTGAAAGAGCCCCCTGT GCTCATCACGCGCCCCTTGGAGGACCAGCTGGTGATGGTGGGGCA GCGGGTGGAGTTTGAGTGTGAAGTATCGGAGGAGGGGGCGCAAGT CAAATGGCTGAAGGACGGGGTGGAGCTGACCCGGGAGGAGACCTT CAAATACCGGTTCAAGAAGGACGGGCAGAGACACCACCTGATCATC AACGAGGCCATGCTGGAGGACGCGGGGCACTATGCACTGTGCACT AGCGGGGGCCAGGCGCTGGCTGAGCTCATTGTGCAGGAAAAGAAG CTGGAGCCCAGGCAGGAACCTCCCAAGATCCACCTGGACTGCCCCA GGCCGCATACCAGACACCATTGTGGTTGTAGCTGGAAATAAGCTAC GTCTGGACGTCCCTATCTCTGGGGACCCCGCTCCCACTGTGATCTG GCAGAAGGCTATCACGCAGGGGAATAAGGCCCCAGCCAGGCCAGC CCCAGATGCCCCAGAGGACACAGGTGACAGCGATGAGTGGGTGTT TGACAAGAAGCTGCTGTGTGAGACCGAGGGCCGGGTCCGCGTGGA GACCACCAAGGACCGCAGCATCTTCACGGTCGAGGGGGCAGAGAA GGAAGATGAGGGCGTCTACACGGTCACAGTGAAGAACCCTGTGGG CGAGGACCAGGTCAACCTCACAGTCAAGGTCATCGACGTGCCAGAC	
---	--

GCACCTGCGGCCCCCAAGATCAGCAACGTGGGAGAGGACTCCTGC ACAGTACAGTGGGAGCCGCCTGCCTACGATGGCGGGCAGCCCATC CTGGGCTACATCCTGGAGCGCAAGAAGAAGAAGAGCTACCGGTGG ATGCGGCTGAACTTCGACCTGATTCAGGAGCTGAGTCATGAAGCGC GGCGCATGATCGAGGGCGTGGTGTACGAGATGCGCGTCTACGCGG TCAACGCCATCGGCATGTCCAGGCCCAGCCCTGCCTCCCAGCCCTT CATGCCTATCGGTCCCCCAGCGAACCCACCCACCTGGCAGTAGAG GACGTCTCTGACACCACGGTCTCCCTCAAGTGGCGGGCCCCCAGAG CGCGTGGGAGCAGGAGGCCTGGATGGCTACAGCGTGGAGTACTGC CCAGAGGGGCTGCTCAGAGTGGGTGGCTGCCCTGCAGGGGCTGACA GAGCACACATCGATACTGGTGAAGGACCTGCCACGGGGGGCCCGG CTGCTTTTCCGAGTGCGGGCACACAATATGGCAGGGCCTGGAGCC CCTGTTACCACCACGGAGCCGGTGACAGTGCAGGAGATCCTGCAAC GGCCACGGCTTCAGCTGCCCAGGCACCTGCGCCAGACCATTGAGA AGAAGGTCGGGGAGCCTGTGAACCTTCTCATCCCTTTCCAGGGCAA GCCCCGGCCTCAGGTGACCTGGACCAAAGAGGGGCAGCCCCTGGC AGGCGAGGAGGTGAGCATCCGCAACAGCCCCACAGACACCATCCT GTTATCCGGGCGCTCGCCGCGTGCATTAGGCACTTACCAGGTG ACGGTGCGCATTGAGAACATGGAGGACAAGGCCACGCTGGTGCTG CAGGTTGTTGACAAGCCAAGTCCTCCCCAGGATCTCCGGGTGACTG ACGCCTGGGGTCTTAATGTGGCTCTGGAGTGGAAGCCACCCCAGG ATGTCGGCAACACGGAACCTCTGGGGGTACACAGTGCAGAAAGCCG ACAAGAAGACCATGGAGTGGTTCACCGTCTTGGAGCATTACCGCCG CACCCACTGCGTGGTGCCAGAGCTCATCATTGGCAATGGCTACTAC TTCCGCGTCTTCAGCCAGAATATGGTTGGCTTTAGTGACAGAGCGG	
--	--

	CCACCACCAAGGAGCCCGTCTTTATCCCCAGACCAGGCATCACCTA TGAGCCACCCAACTATAAGGCCCTGGACTTCTCCGAGGCCCAAGC TTCACCCAGCCCCTGGTGAACCGCTCGGTCATCGCGGGCTACACTG CTATGCTCTGCTGTGCTGTCCGGGGTAGCCCCAAGCCCAAGATTTC CTGGTTCAAGAATGGCCTGGACCTGGGAGAAGACGCCCGCTTCCG CATGTTCAAGCAAGCAGGGAGTGTTGACTCTGGAGATTAGAAAGCCC TGCCCCTTTGACGGGGGCATCTATGTCTGCAGGGCCACCAACTTAC AGGGCGAGGCACGGTGTGAGTGCCGCCTGGAGGTGCGAGTGCCTC AGTAA	
--	---	--

Tabla 4B. Secuencias de proteínas MYBPC3 ilustrativas

Nombre	Secuencia de proteínas	SEQ ID NO.
MYBPC3	MPEPGKKPVSAFSKKPRSVEVAAGSPAVFEATERAGVKVRWQRGGS DISASNKYGLATEGTRHTLTVREVGPADQGSYAVIAGSSKVKFDLKVIE AEKAEPMLAPAPAPAEATGAPGEAPAPAAELGESAPSPKGSSSAALNG PTPGAPDDPIGLFVMRPQDGEVTVGGSITFSARVAGASLLKPPVVKWF KGKWVDLSSKVGQHLQLHDSYDRASKVYLFELHITDAQPAFTGSYRCE VSTKDKFDCSNFNLTVHEAMGTGDLDLLSAFRRTSLAGGGRRISDSHE DTGILDFSSLLKKRDSFRTPRDSKLEAPAEEDVWEILRQAPPSEYERIAF QYGVTDLRGMLKRLKGMRRDEKKSTAFQKKLEPAYQVSKGHKIRLTVE LADHDAEVKWLKNGQEIQMSGSKYIFESIGAKRTLTIQCSLADDAAYQ CVVGGEKCSSTELFVKEPPVLITRPLEDQLVMVGQRVEFECEVSEEGAQ	103

	VKWLKDGVELTREETFKYRFKKDQQRHHLIINEAMLEDAGHYALCTSG GQALAEIVQEKKLEVYQSIADLMVGAKDQAVFKCEVSDENVRGVWLK NGKELVPDSRIKVSHIGRVHKLTIDDVTPADEADYSFVPEGFACNLSAKL HFMEVKIDFVPRQEPPKIHLDPCGRIPDTIVVVAGNKLRLDVPISGDPAP TVIWQKAITQGNKAPARPAPDAPEDTGDSDEWVFDKLLCETEGRVRV ETTKDRSIFTVEGAKEDEGVYTVTVKNPVGEDQVNLTVKVIDVPDAPA APKISNVGEDSCTVQWEPPAYDGGQPILGYILERKKKKSYRWMRLNFD LIQELSHEARRMIEGVVYEMRVYAVNAIGMSRSPASQPFMPIGPPSEP THLAVEDVSDTTVSLKWRPPERVGAGGLDGYSVEYCPEGCSEWVAAL QGLTEHTSILVKDLPTGARLLFRVRAHNMAGPGAPVTTTEPVTVQEILQ RPRLQLPRHLRQTIQKKVGEPVNLLIPFQGKPRPQVTWTKEGQPLAGE EVSIRNSPTDTILFIRAARRVHSGTYQVTVRIENMEDKATLVLQVVDKPS PPQDLRVTDWGLNVALEWKPPQDVGNTLWGYTVQKADKKTMEWF TVLEHYRRTHCVPELIIIGNGYFRVFSQNMVGFSDRAATTKEPVFIPR PGITYEPPNYKALDFSEAPSFTQPLVNRSVIAGYTAMLCCA VRGSPKPK ISWFKNGLDLGEDARFRMFSKQGVLTLEIRKPCPFDGGIYVCRATNLQG EARCECRLEVRVPQ	
MYBPC3- delC3	MPEPGKKPVSAFSKKPRSVEVAAGSPAVFEAETERAGVKVRWQRGGS DISASNKYGLATEGTRHTLTVREVGPADQGSYAVIAGSSKVKFDLKVIE AEKAEPMLAPAPAPAEATGAPGEAPAPAAELGESAPSPKGSSSAALNG PTPGAPDDPIGLFVMRPQDGEVTVGGSITFSARVAGASLLKPPVVKWF KGKWVDLSSKVGQHLQLHDSYDRASKVYLFELHITDAQPAFTGSYRCE VSTKDKFDCSNFNLTVHEAMGTGDLDLLSAFRRTSLAGGGRRISDSHE DTGILDFSSLLKKRDSFRTPRDSKLEAPAEEDVWEILRQAPPSEYERIAF QYGVTDLRGMLKRLKGMRRDEKKSTAFQKKLEPAYQVSKGHKIRLTVE	104

	LADHDAEVKWLKNGQEIQMSGSKYIFESIGAKRTLISQCSLADDAAYQ CVVGGEKCASTELFVKEPPVYQSIADLMVGAKDQAVFKCEVSDENVRGV WLKNGKELVPDSRIKVSHIGRVHKLTI DDVTPADEADYSFVPEGFACNL SAKLHFMEVKIDFVPRQEPPKIHLD CPGRIPDTIVVAGNKLRLDVPISG DPAPTVIWQKAITQGNKAPARPAPDAPEDTGDSDEWVFDKLLCETEG RVRVETTKDRSIFTVEGAKEKEDEGVYTVTVKNPVGEDQVNLT VKVIDVP DAPAAPKISNVGEDSCTVQWEPPAYDGGQPILGYILERKKKKS YRWMR LNFDLIQELSHEARRMIEGVVYEMRVYAVNAIGMSRPSPASQPFMPIGP PSEPTHLAVEDVSDTTVSLKWRPPERVGAGGLDGYSVEYCPEGCSEW VAALQGLTEHTSILVKDLPTGARLLFRVRAHN MAGPGAPVTTTEPVTVQ EILQRPRLQLPRHLRQTIQKKVGEPVNLLIPFQ GKPRPQVTWTKEGQPL AGEEVSIRNSPTDITL FIRAARRVHSGTYQVTVRIENMEDKATLV LQVVD KPSP PQDLRVTD AWGLNVALEWKPPQDVG NTELWGYTVQKADK KTM EWFTVLEHYRRTHCVVPELIIGNGY YFRVFSQNMVGFSDRAATTKEPV FIPRPGITYEPPNYKALDFSEAPSFTQPLVNRSVIAGYTAMLCCA VRGSP KPKISWFKNGLDLGEDARFRMFSKQGVLTLEIRKPCPFDGGIYVCRATN LQGEARCECRLEVRVPQ	
MYBPC3- delC4	MPEPGKKPVSAFSKKPRSVEVAAGSPAVFEAETERAGVKVRWQRGGS DISASNKYGLATEGTRHTLTVREVGPADQGSYAVIAGSSKVKFDLKVIE AEKAEPMLAPAPAPAEATGAPGEAPAPAAELGESAPSPKGSSSAALNG PTPGAPDDPIGLFVMRPQDGEVTVGGSITFSARVAGASLLKPPVVKWF KGKWVDLSSKVGQHLQLHDSYDRASKVYLFELHITDAQPAFTGSYRCE VSTKDKFDCSNFNLT VHEAMGTGDLDLLSAFRRTSLAGGGRRISDSHE DTGILDFSSLLKKRDSFRTPRDSKLEAPAEEDVWEILRQAPPSEYERIAF QYGVTDLRGMLKRLKGMRRDEKKSTAFQKKLEPAYQVSKGHKIRLTVE	105

	LADHDAEVKWLKNGQEIQMSGSKYIFESIGAKRTLTIQCSLADDAAYQ CVVGGEKCSSTELFVKEPPVLITRPLEDQLVMVGQRVEFECEVSEEGAQ VKWLKDGVELTREETFKYRFKKDQQRHHLIINEAMLEDAGHYALCTSG GQALAEIVQEKKLEPPKIHLDPCGRIPDTIVVVAGNKLRLDVPISGDPAP TVIWQKAITQGNKAPARPAPDAPEDTGDSDEWVFDKLLCETEGRVRV ETTKDRSIFTVEGAKEDEGVYTVTVKNPVGEDQVNLTVKVIDVPDAPA APKISNVGEDSCTVQWEPPAYDGGQPILGYILERKKKKSYRWMRLNFD LIQELSHEARRMIEGVVYEMRVYAVNAIGMSRSPASQPFMPIGPPSEP THLAVEDVSDTTVSLKWRPPERVGAGGLDGYSVEYCPEGCSEWVAAL QGLTEHTSILVKDLPTGARLLFRVRAHNMAGPGAPVTTTEPVTVQEILQ RPRLQLPRHLRQTIQKKVGEPVNLLIPFQGKPRPQVTWTKEGQPLAGE EVSIRNSPTDTILFIRAARRVHSGTYQVTVRIENMEDKATLVLQVVDKPS PPQDLRVTDWGLNVALEWKPPQDVGNTLWGYTVQKADKKTMEWF TVLEHYRRTHCVPELIIGNGYFRVFSQNMVGFSDDRAATTKEPVFIPR PGITYEPPNYKALDFSEAPSFTQPLVNRSVIAGYTAMLCCA VRGSPKPK ISWFKNGLDLGEDARFRMFSKQGVLTLEIRKPCPFDGGIYVCRATNLQG EARCECRLEVRVPQ	
MYBPC3- delC4b	MPEPGKKPVSAFSKKPRSVVEVAAGSPAVFEAETERAGVKVRWQRGGS DISASNKYGLATEGTRHTLTVREVGPADQGSYAVIAGSSKVKFDLKVIE AEKAEPMLAPAPAPAEATGAPGEAPAPAAELGESAPSPKGSSSAALNG PTPGAPDDPIGLFVMRPQDGEVTVGGSITFSARVAGASLLKPPVVKWF KGKWVDLSSKVGQHLQLHDSYDRASKVYLFELHITDAQPAFTGSYRCE VSTKDKFDCSNFNLTVHEAMGTGDLDLLSAFRRTSLAGGGRRISDSHE DTGILDFSSLLKKRDSFRTPRDSKLEAPAEEDVWEILRQAPPSEYERIAF QYGVTDLRGMLKRLKGMRRDEKKSTAFQKKLEPAYQVSKGHKIRLTVE	106

	LADHDAEVKWLKNGQEIQMSGSKYIFESIGAKRTLISQCSLADDAAYQ CVVGGEKCSSTELFVKEPPVLITRPLEDQLVMVGQRVEFECEVSEEGAQ VKWLKDGVELTREETFKYRFKKDGGQRHHLIINEAMLEDAGHYALCTSG GQALAEIVQEKKLEPRQEPPKIHLDGCPGRIPDTIVVVAGNKLRLDVPIS GDPAPTIVWQKAITQGNKAPARPAPDAPEDTGDSDEWVFDKLLCETE GRVRVETTKDRSIFTVEGAKEKEDEGVYTVTVKNPVGEDQVNLTVKVIDV PDAPAAPKISNVGEDSCTVQWEPPAYDGGQPILGYILERKKKKSYRWM RLNFDLIQELSHEARRMIEGVVYEMRVYAVNAIGMSRSPASQPFMPIG PPSEPTHLAVEDVSDTTVSLKWRPPERVGAGGLDGYSVEYCPEGCSE WVAALQGLTEHTSILVKDLPTGARLLFRVRAHNMAGPGAPVTTTEPVTV QEILQRPRQLPRHLRQTIQKKVGEPVNLLIPFQGKPRPQVTWTKEGQP LAGEEVSIRNSPTDITLFIARAARRVHSGTYQVTVRIENMEDKATLVLQVV DKPSPPPQDLRVTDWGLNVALEWKPPQDVGNTLWGYTVQKADKKT MEWFTVLEHYRRTHCVPELIIGNGYFRVFSQNMVGFSDRAATTKEP VFIPRPGITYEPPNYKALDFSEAPSFTQPLVNRSVIAGYTAMLCCAVERGS PKPKISWFKNGLDLGEDARFRMFSKQGVLTLEIRKPCPFDGGIYVCRAT NLQGEARCECRLEVRVPQ	
--	---	--

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína del miembro 2 de la subfamilia H del canal activado por voltaje de potasio (KCNH2), enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 cardíaco modificado) es *KCNH2*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 107). En seres humanos, el gen *KCNH2* codifica la proteína KCNH2 (también conocida como

hERG1, *p. ej.*, SEQ ID NO 108), que forma un canal de potasio con otras proteínas KCNH2 para transportar potasio fuera de las células. Las proteínas KCHN2 se expresan abundantemente en el músculo cardíaco, que funciona para recargar el tejido cardíaco después de cada latido cardíaco para mantener un ritmo regular. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica

5 KCNH2 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 107. En algunas modalidades, la proteína KCNH2 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 108.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de membrana 4 de la subfamilia M del canal de cationes

10 con potencial de receptor transitorio (TRPM4), enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 cardíaco modificado) es *TRPM4*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 109). En seres humanos, el gen *TRPM4* codifica la proteína TRPM4 (*por ejemplo*, SEQ ID

15 NO 110), que funciona como un canal para controlar el flujo de cationes dentro y fuera de las células. El canal TRPM4 se expresa abundantemente en las células cardíacas y desempeña un papel clave en la generación y transmisión de señales eléctricas. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica TRPM4 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 109. En algunas modalidades, la proteína TRPM4 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 110.

20

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína desmogleína 2 (DSG2), enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por*

25 *ejemplo*, un promotor de TNNT2 cardíaco modificado) es *DSG2*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 111). En seres humanos, el gen *DSG2* codifica la proteína

DSG2 (*p. ej.*, SEQ ID NO 112), que es una glucoproteína transmembrana y un componente de desmosomas. Los desmosomas son uniones intercelulares que proporcionan una fuerte adhesión entre las células, lo que otorga fuerza mecánica a los tejidos. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica DSG2 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 111. En algunas modalidades, la proteína DSG2 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 112.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína transportadora de calcio de retículo sarcoplasmático/endoplasmático de ATPasa 2 (ATP2A2), enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es ATP2A2, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 113). En los seres humanos, el gen ATP2A2 codifica la proteína ATPasa de calcio del retículo sarco(endo)plasmático 2 (SERCA2) (*p. ej.*, SEQ ID NO 114), que cataliza la hidrólisis de ATP acoplada con la translocación de calcio del citosol al lumen del retículo sarcoplásmico. La regulación de los iones de calcio dentro y fuera del retículo sarcoplásmico ayuda a la contracción y relajación muscular. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica ATP2A2 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 113. En algunas modalidades, la proteína ATP2A2 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 114.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína alfa 1C del canal activado por voltaje de calcio (CACNA1C), enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es CACNA1C, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 115). En seres humanos, el gen

CACNA1C codifica la subunidad alfa 1 de una proteína del canal de calcio dependiente del voltaje (*p. ej.*, SEQ ID NO 116), que funciona para mediar el influjo de iones de calcio en la célula tras la polarización de la membrana. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica CACNA1C comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 115. En algunas modalidades, la proteína CACNA1C comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 116.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína distrofina (DMD), enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es *DMD*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 117). En seres humanos, el gen *DMD* codifica la proteína DMD (*p. ej.*, SEQ ID NO 118), que forma un componente del complejo distrofina-glucoproteína (DGC). El DGC actúa como anclaje, conectando el citoesqueleto con la matriz extracelular, fortaleciendo así las miofibras y protegiéndolas de lesiones a medida que los músculos se contraen y se relajan. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica DMD comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 117. En algunas modalidades, la proteína DMD comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 118.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína cinasa de proteína DM1 (DMPK), enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es *DMPK*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 119). En seres humanos, el gen *DMPK* codifica la proteína cinasa de la proteína de distrofia miotónica (*p. ej.*, SEQ ID NO 120), que desempeña un papel importante en el desarrollo y la homeostasis del cerebro, los músculos y el corazón. La

proteína cinasa de la distrofia miotónica inhibe la miosina fosfatasa, que desempeña un papel en la tensión y relajación muscular. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica DMPK comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 119. En algunas modalidades, la proteína DMPK comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 120.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína homóloga a la proteína de gránulos P 5 (EPG5) ectópica, enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es *EPG5*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 121). En seres humanos, el gen *EPG5* codifica la proteína EPG5 (*p. ej.*, SEQ ID NO 122), que funciona en la autofagia para promover la interacción entre los autofagosomas y los lisosomas. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica EPG5 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 121. En algunas modalidades, la proteína EPG5 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 122.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de subunidad 1 del complejo ciliar EvC (EVC), enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es *EVC*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 123). En seres humanos, el gen *de EVC* codifica la proteína EVC (*p. ej.*, SEQ ID NO 124), que se encuentra principalmente en los cilios, y funciona para transmitir información entre células. La proteína EVC también regula Sonic Hedgehog, que desempeña un papel en el crecimiento y la diferenciación celular. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica EVC comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con

la SEQ ID NO 123. En algunas modalidades, la proteína EVC comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 124.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína limbina, enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es *EVC2*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 125). En seres humanos, el gen *EVC2* codifica la proteína limbina (*p. ej.*, SEQ ID NO 126). Si bien se desconoce la función de la limbina, es importante para el crecimiento y el desarrollo normales, especialmente el desarrollo de los huesos y los dientes. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica limbina comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 125. En algunas modalidades, la proteína limbina comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 126.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína fibrilina-1, enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es *FBN1*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 127). En seres humanos, el gen *FBN1* codifica proteínas de fibrilina-1 y asprosinas (*p. ej.*, SEQ ID NO 128). La fibrilina-1 es una glucoproteína que sirve como componente estructural de las microfibrilas de unión al calcio, que proporcionan soporte con fuerza en tejido conjuntivo elástico y no elástico en todo el cuerpo. La asprosinas es una hormona que normalmente secreta el tejido adiposo blanco para regular la homeostasis de la glucosa. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica fibrilina-1 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 127. En algunas modalidades, la proteína fibrilina-1 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 128.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína neurofibromina (NF1), enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es *NF1*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 129). En seres humanos, el gen *NF1* codifica la proteína NF1 (*por ejemplo*, SEQ ID NO 130), que funciona como un supresor de tumor y regulador negativo de la vía de señalización Ras que estimula el crecimiento y la división celulares. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica NF1 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 129. En algunas modalidades, la proteína NF1 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 130.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de la subunidad alfa de la proteína del canal de sodio tipo 5 (SCN5A), enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es *SCN5A*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 131). En seres humanos, el gen de *SCN5A* codifica la proteína SCN5A (*p. ej.*, SEQ ID NO 132), que es una subunidad de canal de sodio activado por voltaje resistente a la tetrodotoxina. El SCN5A se encuentra principalmente en el músculo cardíaco y es responsable de la carrera ascendente inicial del potencial de acción en un electrocardiograma. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica SCN5A comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 131. En algunas modalidades, la proteína SCN5A comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 132.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de hijo de homólogo sin siete 1 (SOS1), enlazada

operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es *SOS1*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 133). En seres humanos, el gen *SOS1* codifica la

5 proteína *SOS1* (*p. ej.*, SEQ ID NO 134), que funciona como un componente de un complejo trimérico que participa en señales de transducción de Ras a Rac al promover la actividad del factor de intercambio de nucleótidos de guanina específico de Rac. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica *SOS1* comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 133. En algunas modalidades, la proteína *SOS1* comparte al menos 90 %, 95

10 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 134.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína del receptor de péptido natriurético 1 (*NPR1*), enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico

15 cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es *NPR1*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 135). El gen *NPR1* en seres humanos codifica la proteína *NPR1* (también denominada GC-A) (*p. ej.*, SEQ ID NO 136), que es un receptor catalítico transmembrana con actividad de guanilil ciclase intracelular. La *NPR1* sirve como receptor de los péptidos natriuréticos auriculares y cerebrales, que son hormonas vasoactivas que desempeñan

20 un papel clave en la homeostasis cardiovascular. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica *NPR1* comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 135. En algunas modalidades, la proteína *NPR1* comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 136.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de

25 polinucleótidos que codifica la proteína receptora tirosina-proteína cinasa *erbB-4* (*ERBB4*), enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en

algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es *ERBB4*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 137). El gen *ERBB4* en seres humanos codifica la proteína ERBB4 en seres humanos (*por ejemplo*, SEQ ID NO 138), que es un receptor transmembrana en la familia de factores de crecimiento epidérmico. La señalización a través del receptor ERBB4 induce una variedad de respuestas celulares, incluida la mitogénesis y la diferenciación. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica ERBB4 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 137. En algunas modalidades, la proteína ERBB4 comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 138.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica el péptido intestinal vasoactivo (VIP), enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es *VIP*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 139). En seres humanos, el gen *VIP* codifica el péptido intestinal vasoactivo (*p. ej.*, SEQ ID NO 140), que funciona como un neuromodulador y neurotransmisor. VIP es un potente vasodilatador que regula la actividad del músculo liso, la secreción de células epiteliales y el flujo sanguíneo en el tracto gastrointestinal. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica VIP comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 139. En algunas modalidades, la proteína VIP comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 140.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la cadena pesada de beta-miosina (MyHC- β), enlazada operativamente a un promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, en algunas modalidades, la secuencia de polinucleótidos enlazada operativamente al promotor específico

cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) es *MYH7*, o mutante, variante o fragmento de este (*por ejemplo*, SEQ ID NO 141). En seres humanos, el gen *MYH7* codifica la proteína MyHC- β (*p. ej.*, SEQ ID NO 142), que es un motor hexamérico y asimétrico que forma la mayoría de los filamentos gruesos en el músculo cardíaco. La actividad enzimática de la ATPasa en el cabezal de miosina hidroliza el ATP, lo que alimenta el proceso de acortar los sarcómeros para generar presión y potencia intraventriculares. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica MyHC- β comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 141. En algunas modalidades, la proteína MyHC- β comparte al menos 90 %, 95 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 142.

III. Vectores

En algunas modalidades, la descripción proporciona vectores para el tratamiento o la prevención de enfermedades cardíacas. En particular, los vectores descritos en la presente descripción comprenden un promotor específico cardíaco enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica una proteína terapéutica, en donde la expresión de la proteína terapéutica trata a un sujeto que lo necesita (*por ejemplo*, un sujeto que tiene miocardiopatía). Por ejemplo, en algunas modalidades, el vector es un vector basado en AAV que comprende el promotor de TNNT2 cardíaco enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica la proteína MYBPC3 para el tratamiento o la prevención de la miocardiopatía.

En algunas modalidades, el vector comprende, además de los promotores específicos cardíacos (*por ejemplo*, un promotor de troponina T cardíaca modificado) y productos génicos terapéuticos (*por ejemplo*, proteína MYBPC3) descritos en la presente descripción, un gen marcador que facilita la identificación o selección de células que se han transfectado, transducido o infectado. Los ejemplos de genes marcadores incluyen, pero no se limitan a, genes que codifican proteínas fluorescentes, *p. ej.*, proteína fluorescente verde mejorada, Ds-Red (DsRed: *Discosoma sp.* red

fluorescent protein (RFP); Bevis et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20(11):83-87), proteína fluorescente amarilla, mCherry, y proteína cianofluorescente; y genes que codifican proteínas que confieren resistencia a un agente de selección, *p. ej.*, un gen de resistencia a la neomicina, un gen de resistencia a la puromicina, un gen de resistencia a la blasticidina, y similares.

- 5 En algunas modalidades, el vector comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene un tamaño de como máximo aproximadamente 4.0 kilobases, como máximo aproximadamente 4.5 kilobases, como máximo aproximadamente 5 kilobases, como máximo aproximadamente 5.1 kilobases, como máximo aproximadamente 5.2 kilobases, como máximo aproximadamente 5.3 kilobases, como máximo aproximadamente 5.4 kilobases, o como máximo aproximadamente 5.5
- 10 kilobases. En algunas modalidades, el vector comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene un tamaño de como máximo aproximadamente 4.5 kilobases. En algunas modalidades, el vector comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene un tamaño de como máximo aproximadamente 5 kilobases. En algunas modalidades, el vector comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene un tamaño de como máximo aproximadamente 5.5 kilobases. En
- 15 algunas modalidades, el vector comprende una secuencia de polinucleótidos que tiene un tamaño de como máximo aproximadamente 6 kilobases.

Los métodos para introducir polinucleótidos en una célula huésped se conocen en la técnica, y cualquier método conocido puede usarse para introducir los polinucleótidos descritos en la presente descripción en una célula. Los métodos adecuados incluyen, *p. ej.*, infección vírica o por

20 bacteriófagos, transfección, conjugación, fusión de protoplastos, lipofección, electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección mediada por polietilenglicol (PEG), transfección mediada por DEAE-dextrán, transfección mediada por liposomas, tecnología de pistola de partículas, precipitación de fosfato de calcio, microinyección directa, suministro de ácidos nucleicos mediado por nanopartículas, métodos de suministro de microfluidos y similares.

25 **A. Vectores no virales**

En algunas modalidades, los polinucleótidos descritos en la presente descripción se suministran a una célula en un vector no viral, tal como un transposón, una nanopartícula (*por ejemplo*, una nanopartícula lipídica), un liposoma, un exosoma, una bacteria atenuada, o una partícula similar a un virus. En algunas modalidades, el vector no viral es una partícula similar a un virus de mamífero. Por ejemplo, puede generarse una partícula similar a un virus de mamífero (*por ejemplo*, mediante purificación de la partícula similar a un virus de mamífero “vacío” seguida de un ensamblaje *ex vivo* de la partícula similar a un virus de mamífero con la carga deseada). El vector no viral también puede diseñarse genéticamente para incorporar ligandos de direccionamiento para alterar la especificidad del tejido diana.

10 **B. Vectores víricos**

En algunas modalidades, el vector es un vector viral. En algunas modalidades, el vector viral es un vector retroviral, *p. ej.*, un vector lentiviral. Como se usa en la presente descripción, el término “retrovirus” o “retroviral” se refiere a un virus de ARN que transcribe de manera inversa su ARN genómico en una copia de ADN bicatenario lineal y posteriormente integra covalentemente su ADN genómico en un genoma del huésped. Los vectores de retrovirus son una herramienta común para el suministro de genes (Miller, *Nature*. 357: 455-460 (2000)). Una vez que el virus se integra en el genoma del huésped, se lo denomina “provirus”. El provirus sirve como plantilla para la polimerasa II del ARN y dirige la expresión de moléculas de ARN codificadas por el virus. En algunas modalidades, un vector retroviral se altera de manera que no se integra en el genoma de la célula huésped.

Los retrovirus ilustrativos (familia Retroviridae) incluyen, de modo no taxativo: (1) género gammaretrovirus, tal como, virus de la leucemia murina Moloney (M-MuLV), virus del sarcoma murino Moloney (MoMSV), virus del tumor mamífero murino (MuMTV), virus de la leucemia del mono gibón (GaLV), y virus de la leucemia felina (FLV), (2) género spumavirus, como el virus

espumoso de los simios, (3) género lentivirus, como el virus de la inmunodeficiencia humana-1 y el virus de la inmunodeficiencia de los simios.

Como se usa en la presente descripción, el término “lentiviral” o “lentivirus” se refiere a un grupo (o género) de retrovirus complejos. Los lentivirus ilustrativos incluyen, pero no se limitan a: VIH (virus de inmunodeficiencia humana; que incluye el VIH tipo 1 y el VIH tipo 2; virus visna-maedi (VMV); el virus de la encefalitis por artritis caprina (CAEV); virus de la anemia infecciosa equina (EIAV); virus de la inmunodeficiencia felina (FIV); virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV); y virus de la inmunodeficiencia en simios (SIV).

En algunas modalidades, vector viral es un vector adenoviral. La organización genética del adenovirus incluye un virus de ADN lineal de doble cadena de aproximadamente 36 kb, que permite la sustitución de grandes piezas de ADN adenoviral con secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus et al., *Seminar in Virology* 200(2):535-546, 1992)).

En algunas modalidades, el vector viral es un vector viral adenoasociado (AVV), tal como un vector de AAV seleccionado del grupo que consiste en el serotipo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, y 10 o AAV quimérico derivado de este.

En algunas modalidades, el vector de expresión de AAV está pseudotipado para mejorar el direccionamiento. Una estrategia de pseudotipificación puede promover la transferencia génica y mantener la expresión en un tipo de célula diana. Por ejemplo, el genoma de AAV2 puede empaquetarse en la cápside de otro serotipo de AAV tal como AAV5, AAV7, o AAV8, que produce vectores pseudotipados tales como AAV2/5, AAV2/7, y AAV2/8 respectivamente, como se describe en Balaji et al. *J Surg Res.* Sep; 184(1): 691–698 (2013). En algunas modalidades, un AAV9 puede usarse para dirigirse a la expresión en linajes similares a miofibroblastos, como se describe en Piras et al. *Gene Therapy* 23:469–478 (2016). En algunas modalidades, se usa AAV1, AAV6 o AAV9, y en algunas modalidades, el AAV se modifica genéticamente, como se describe en Asokari et al. *Hum Gene Ther.* Nov; 24(11): 906–913 (2013); Pozsgai et al. *Mol Ther.* 5 de abril; 25(4): 855–869 (2017); Kotterman, M.A. y D.V. Schaffer *Engineering Adeno-Associated*

Viruses for Clinical Gene Therapy. *Nature Reviews Genetics*, 15:445-451 (2014); y US20160340393A1 a Schaffer et al. En algunas modalidades, el vector viral es AAV modificado genéticamente para aumentar la infectividad de las células diana como se describe en US20180066285A1.

5 **C. Elementos reguladores**

En algunas modalidades, la descripción proporciona un vector que comprende uno o más elementos reguladores enlazados operativamente a un polinucleótido que codifica una proteína terapéutica o ácido nucleico. En algunas modalidades, el elemento regulador es un promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado) que se une operativamente a una proteína terapéutica o ácido nucleico para el tratamiento de la enfermedad cardíaca.

Como se usa en la presente descripción, el término “elemento regulador” se refiere a aquellas regiones no traducidas del vector (*por ejemplo*, el origen de replicación, los casetes de selección, los promotores, los potenciadores, las señales de iniciación de la traducción (secuencia Shine Dalgarno o secuencia Kozak) los intrones, una secuencia de poliadenilación, las regiones no traducidas 5' y 3') que interactúan con las proteínas celulares del huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Dichos elementos pueden variar en su fuerza y especificidad. El elemento regulador de la transcripción puede ser funcional en una célula eucariota (*por ejemplo*, una célula de mamífero) o una célula procariota (*por ejemplo*, una célula bacteriana o arqueal). En algunas modalidades, una secuencia de polinucleótidos que codifica los productos génicos terapéuticos (*por ejemplo*, una proteína terapéutica o ácido nucleico) descrita en la presente descripción se enlaza operativamente a múltiples elementos de control que permiten la expresión del polinucleótido tanto en células procariotas como eucariotas.

Como se usa en la presente descripción, el término “sitio de inicio de la transcripción” o “TSS” se refiere al primer par de bases transcrito por una polimerasa de ARN cuando la polimerasa de ARN inicia la transcripción. Un TSS es diferente del codón de inicio (canónicamente, ATG), que debe estar corriente abajo del TSS en la región transcrita del polinucleótido. La ubicación de un

sitio de inicio de la transcripción puede determinarse experimentalmente o mediante predicción mediante el uso de cualquiera de los diversos algoritmos de predicción. Los TSS anotados están disponibles en la base de datos de promotores eucariotas y en el navegador de genomas UCSC. Se identifican múltiples TSS para TNNT2 en el navegador de genomas UCSC.

- 5 Como se usa en la presente descripción, el TSS para TNNT2 se define como la secuencia identificada por la C en el extremo 5' del motivo identificado por dbTSS: CTCCATC.

El término “promotor de TNNT2 cardíaco modificado”, tal como se usa en la presente descripción, se refiere a un promotor que comprende una secuencia de polinucleótidos de al menos 200 pares de bases que comprende uno o más segmentos de polinucleótidos continuos o discontinuos que
 10 comparten cada uno 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con un segmento correspondiente del segmento TNNT2p-600 proporcionado en la Tabla 1 como SEQ ID NO 1. Dado que es un “promotor”, un promotor de TNNT2 cardíaco modificado debe ser capaz de promover el inicio de la transcripción por una polimerasa de ARN en un huésped o célula diana en o cerca de un TSS dentro del promotor (*es decir*, en o cerca del TSS de TNNT2 como se define
 15 en la presente descripción) o, si el TSS endógeno de TNNT2 no está presente en el promotor de TNNT2 cardíaco modificado, entonces en un TSS heterólogo como máximo 100 pares de bases corriente abajo (3' en la cadena de sentido) del extremo corriente abajo (3') del promotor de TNNT2 cardíaco modificado. De manera similar, un promotor de TNNT2 cardíaco modificado puede comprender solo secuencias corriente arriba del TSS de TNNT2 o más comprende el TSS
 20 de TNNT2.

La longitud de un promotor (*p. ej.*, un promotor de TNNT2 cardíaco modificado), un promotor “que tiene” tantos pares de bases, como se usa en la presente descripción, se define de acuerdo al número de pares de bases en la secuencia de polinucleótidos del promotor desde su extremo 5' hasta su extremo 3', incluidos los puntos de extremo, e inclusive cualquier secuencia intermedia
 25 que no se alinee con una secuencia de promotor de referencia (*p. ej.*, el promotor de TNNT2 cardíaco endógeno de un humano u otro organismo). El extremo 5' y el extremo 3' del promotor

se definen como el último par de bases en cualquier dirección para coincidir con una secuencia correspondiente en una secuencia de promotor de referencia cuando la secuencia se alinea mediante el algoritmo BLAST o el equivalente. Por lo tanto, la longitud de un promotor en un vector puede determinarse mediante la búsqueda en una base de datos de nucleótidos que contiene un genoma de un organismo de referencia mediante el uso de la secuencia de polinucleótidos del vector y la identificación de una o más regiones alineadas que abarcan o están dentro de aproximadamente 1-5 kb de un gen endógeno, o mediante la alineación del vector a un promotor de referencia predeterminado. Si el promotor se alinea con el genoma de referencia o la secuencia del promotor de referencia como un segmento continuo, entonces la longitud del promotor es la alineación de longitud informada (la posición de extremo 3' menos la posición de extremo 5', + 1 a menos que se incluya el TSS). Si el promotor se alinea en múltiples segmentos (*por ejemplo*, 2, 3, 4, o 5 segmentos), entonces la longitud del promotor puede calcularse por la posición de extremo 3' del segmento más 3' del genoma de referencia o secuencia promotora de referencia, menos la posición de extremo 5' del segmento más 5' del genoma de referencia o secuencia promotora de referencia, más 1 a menos que se incluya el TSS (de manera que la longitud calculada incluya ambos puntos de extremo). Por ejemplo, la longitud de un promotor que se extiende desde un par de bases 100 pb antes del TSS (-100 pb) hasta 5 pb antes del TSS (-5 pb) es $-5 - (-100) + 1 = 100 - 5 + 1 = 96$ pb. El TSS está numerado con +1 pb. Por lo tanto, la longitud de un promotor que se extiende desde un par de bases 100 pb antes del TSS (-100 pb) hasta 5 pb después del TSS (+5 pb) es $+5 - (-100) = 100 + 5 = 105$ pb.

El término “potenciador” se refiere a un segmento de ADN que contiene secuencias capaces de proporcionar una transcripción mejorada y, en algunos casos, puede funcionar independientemente de su orientación con relación a otra secuencia de control. Un potenciador puede funcionar cooperativa o aditivamente con promotores y/u otros elementos potenciadores. Un potenciador puede superponerse con un promotor o estar corriente arriba o corriente abajo del promotor. En algunas modalidades, el promotor de TNNT2 cardíaco modificado comprende

uno o más potenciadores. En algunas modalidades, el promotor de TNNT2 cardíaco modificado no comprende ningún potenciador.

Además o en lugar de un promotor de TNNT2 cardíaco modificado, algunas modalidades emplean otros promotores eucariotas, incluidos, entre otros: citomegalovirus (CMV) inmediatamente temprana, timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV), un virus de simio viral 40 (SV40) (*p. ej.*, SV40 temprana y tardía), un promotor del virus que forma foco en el bazo (SFFV), repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus (*p. ej.*, un promotor de la LTR del virus de la leucemia murina Moloney (MoMLV) o una LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV)), un promotor del virus del herpes simple (VHS) (timidina cinasa), H5, P7.5, y los promotores P11 del virus vaccinia, un promotor del factor de elongación 1-alfa (EF1 α), promotor de la respuesta de crecimiento temprano 1 (EGR1), un promotor de ferritina H (FerH), un promotor de ferritina L (FerL), un promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), un promotor del factor de iniciación de la traducción eucariota 4A1 (EIF4A1), un promotor de la proteína 5 de 70kDa de choque térmico (HSPA5), un promotor de la proteína de choque térmico 90kDa beta, miembro 1 (HSP90B1), un promotor de la proteína de choque térmico 70kDa (HSP70), un promotor de la β -cinesina (β -KIN), el locus humano de 26 de Pinta (Irions *et al.*, *Nature Biotechnology* 25, 1477-1482 (2007), un promotor de ubiquitina C (UBC), un promotor de la fosfoglicerato cinasa 1 (PGK), un potenciador de citomegalovirus/promotor de la β -actina de pollo (CAG), un promotor de la β -actina y un potenciador del virus del sarcoma mieloproliferativo, región de control negativo eliminada, promotor sustituto del sitio de unión al cebador (MND) dI587rev, y metalotioneína-I de ratón. El vector también puede contener un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias de polinucleótidos para amplificar la expresión. El vector también puede incluir secuencias de polinucleótidos que codifican etiquetas de proteína (*p. ej.*, etiqueta 6xHis, etiqueta de hemaglutinina, proteína fluorescente verde, etc.) que se fusionan al polipéptido modificador dirigido al sitio, lo que resulta en un polipéptido quimérico.

En algunas modalidades, los promotores de la descripción son específicos del tejido. El término “promotor específico del tejido” significa una secuencia de polinucleótidos que sirve como promotor, *es decir*, regula la expresión de una secuencia de polinucleótidos seleccionada enlazada operativamente al promotor, y que afecta la expresión de la secuencia de polinucleótidos seleccionada en células específicas de un tejido, tales como miocitos o células miocárdicas. En algunas modalidades, el promotor específico de tejidos es un promotor específico cardíaco. En algunas modalidades, el promotor específico cardíaco es TNNT2 o un promotor de TNNT2 modificado. Un promotor tisular específico provoca la expresión de un polinucleótido enlazado operativamente, o un producto génico codificado por ese polinucleótido, a niveles 5x, 10x, 20x, 25x o mayores en el tejido de interés que en un tejido de referencia.

En algunas modalidades, los vectores descritos en la presente descripción comprenden una señal de terminación de la transcripción. Los elementos que dirigen la terminación eficiente y la poliadenilación de los transcritos de ácido nucleico heterólogo aumentan la expresión génica heteróloga. Las señales de terminación de la transcripción generalmente se encuentran corriente abajo de la señal de poliadenilación. En algunas modalidades, los vectores comprenden una secuencia de poliadenilación 3' de un polinucleótido que codifica un polipéptido que se va a expresar. El término “sitio de poliA” o “secuencia de poliA” como se usa en la presente descripción denota una secuencia de ADN que dirige tanto la terminación como la poliadenilación del transcrito de ARN naciente por la polimerasa II del ARN. Las secuencias de poliadenilación pueden promover la estabilidad del ARNm mediante la adición de una cola de poliA al extremo 3' de la secuencia codificante y, por lo tanto, contribuir a una mayor eficacia de la traducción. La escisión y poliadenilación se dirigen por una secuencia poli(A) en el ARN. La secuencia de núcleo poli(A) para los pre-ARNm de mamíferos tiene dos elementos de reconocimiento que flanquean un sitio de escisión-poliadenilación. Típicamente, un hexámero AAUAAA casi invariable se encuentra en 20-50 nucleótidos corriente arriba de un elemento más variable rico en residuos U o GU. La escisión de la transcripción incipiente se produce entre estos dos elementos y se acopla

a la adición de hasta 250 adenosinas al producto de escisión 5'. En modalidades particulares, la secuencia de núcleo poli(A) es una secuencia de poliA ideal (*por ejemplo*, AATAAA, ATTAAA, AGTAAA). En modalidades particulares, la secuencia de poli(A) es una secuencia de poliA SV40, una secuencia de poliA de hormona de crecimiento bovina (BGHpA), una secuencia de poliA de β -globina de conejo (r β gpA), variantes de esta, u otra secuencia de poliA heteróloga o endógena adecuada conocida en la técnica.

IV. Genoma viral del virus adenoasociado recombinante (rAAV), casete de expresión y viriones del rAAV

La descripción proporciona un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un transgén, *p. ej.*, una secuencia que codifica un polipéptido MYBPC3, o variante funcional de este. La secuencia polinucleotídica del transgén en un casete de expresión puede ser, por ejemplo, un marco de lectura abierto que codifica una proteína. El casete de expresión puede comprender, opcionalmente, un promotor enlazado operativamente al transgén, opcionalmente una región de intrón, opcionalmente una señal de poliadenilación (poli(A)), opcionalmente un elemento postranscripcional del virus de la hepatitis Woodchuck (WPRE), y opcionalmente una señal de terminación de la transcripción. El casete de expresión puede estar flanqueado por una o más repeticiones terminales invertidas (ITR). Un casete de expresión flanqueado por una o más ITR se denomina en la presente descripción "genoma viral". Las ITR en un casete de expresión sirven como marcadores usados para el empaque viral del casete de expresión (Clark y otros *Gen Hum Ther.* 6:1329-41 (1995)). Las modalidades ilustrativas y no limitantes de genomas virales de la descripción se muestran en la **Figura 1A, Figura 1C, y Figura 2A**. El polinucleótido que codifica el casete de expresión proporciona la función de expresar el transgén dentro de una célula huésped. El casete de expresión puede integrarse en el genoma de la célula huésped, por ejemplo, al infectar la célula huésped con un virión de rAAV que comprende la proteína de la cápside y un genoma viral que comprende un casete de expresión.

La secuencia promotora del casete de expresión, cuando está presente, controla la expresión del polinucleótido que codifica el transgén, *p. ej.*, una secuencia que codifica MYBPC3 o variante funcional de este. Se pueden usar varios promotores. El promotor puede ser específico del tipo de célula. Los promotores constitutivos se usan en casetes de expresión y pueden ser, por ejemplo, el potenciador de citomegalovirus fusionado al promotor de actina β de pollo (CAG), el promotor de virus simio 40 (SV40) y el promotor de timidina cinasa del virus de herpes simple (HSV-TK) (Damdindorj y otros *PLoS One*. 9:e106472 (2014)). También pueden usarse otros promotores específicos del tipo de célula. Los promotores específicos de células cardíacas pueden ser, por ejemplo, el promotor MLC2v (Phillips et al. *Hypertension*. 39:651-5 (2002)) y el promotor de troponina T cardíaca (cTnT) (Konkalmatt et al. *Circ Cardiovasc Imaging*. 6:478–486 (2013)).

En algunos aspectos, la descripción proporciona promotores que se han optimizado para la expresión y longitud específicas de células cardíacas para alojar transgenes de tamaño especificado. En una modalidad, el promotor de un genoma del vector de rAAV descrito en la presente descripción es un polinucleótido que tiene entre 300 pb y 500 pb.

Las secuencias ilustrativas de casete de expresión y genoma viral de la descripción pueden encontrarse en la Tabla 5. En algunas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de polinucleótidos que comparte al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 95, SEQ ID NO 99, o SEQ ID NO 101. En algunas modalidades, el genoma viral comprende una secuencia de polinucleótidos que comparte al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 98, SEQ ID NO 100, o SEQ ID NO 102. En otra modalidad, un casete de expresión puede segmentarse de acuerdo con las regiones de polinucleótidos que flanquean el transgén. La secuencia de polinucleótidos que abarca el extremo 5' del casete al extremo 5' del transgén se denomina en la presente descripción el segmento 5' del casete de expresión. La secuencia de polinucleótidos que abarca el extremo 3' del transgén hasta el extremo 3' del casete de expresión se denomina en la presente

descripción el segmento 3' del casete de expresión. En una modalidad, el segmento 5' del casete de expresión comprende una secuencia polinucleotídica que comparte al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 93. En una modalidad, el segmento 3' del casete de expresión comprende una secuencia polinucleotídica que comparte al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la SEQ ID NO 94.

La capacidad de expresar transgenes grandes administrados por vectores de rAAV o viriones de rAAV es limitada. Los tamaños del genoma del vector de rAAV tienen una longitud de secuencia máxima de aproximadamente 5 kb, lo que proporciona un límite para la longitud de todos los elementos requeridos en un casete de expresión que incluye elementos reguladores, *p. ej.*, promotor, y un transgén, *p. ej.*, MYBPC3. Los genomas del vector de rAAV que superan los 5 kb dan como resultado el truncamiento del genoma del vector durante el empaque del virión de rAAV y reducen o ablacionan la expresión del transgén (Wu et al. *Mol Ther.* 18:80-86 (2010)). En algunas modalidades, la presente descripción proporciona genomas de vectores de rAAV que se optimizan para transportar transgenes grandes. Los elementos del genoma del vector se han reducido en longitud para alojar un transgén más grande. En una modalidad, el segmento 5' y el segmento 3' de un casete de expresión juntos comprenden como máximo 0.8 kpb o como máximo 0.9 kpb. En otra modalidad, la ITR 5', el segmento 5', el segmento 3' y la ITR 3' juntos comprenden 1.2 kpb o como máximo comprenden 1.3 kpb. En una modalidad, el segmento 5' comprende como máximo 500 pb o como máximo 480 pb. En una modalidad, el segmento 3' comprende como máximo 200 pb o como máximo 150 pb. En otra modalidad, el genoma del vector comprende como máximo 4.7 kpb, 4.8 kpb, 4.9 kpb o 5.0 kpb. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica el producto génico comprende entre 3 kb y 11 kb, entre 3 kpb y 5 kpb, entre 3.5 kpb y 4.5 kpb, o entre 3.7 kpb y 4 kpb. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica el producto génico comprende de 3.7 kpb a 3.9 kpb. En algunas modalidades, el polinucleótido que codifica el producto génico comprende 3.8 kpb.

Tabla 5. Casete de expresión ilustrativa y genomas virales

Nombre	Secuencia de ADN	SEQ ID NO.
genoma viral (promotor de 600 pb)	Ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgctcgggcgaccttggt cgccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtggccaactccatcactaggg gttcctttagttaatgattaacccgcatgctacttatctacgtagccatgctctaggaagatcgga attcgcccttaagtcatggagaagaccaccttcagatgtcctcactggggctggcagagccg gcaacctgccaaggctgctcagtcattaggagccagtagcctggaagatgtctttaccccca gcatcagttcaagtggagcagcacataactcttgccctctgcctccaagattctggtgctgagact tatggagtgtcttgagggtgcctctgcccccaacctgtcccagctggccctcccaggcctg ggttgctggcctctgctttatcaggattctcaagagggacagctggttatgttgcatgactgttcct gcatatctgctctggttttaaatagcttatctgagcagctggaggaccacatgggcttatatggcggtg gggtagatgttctgtagcctgtccctggcacctgcaaaaatagcagccaacacccccacccc caccgcatccccctgccccaccgtcccctgtcgacattcctccctccgcagggctggctcac caggccccagcccacatgctgtctaaagccctctccatcctctgcctcaccagctcccgtga gactgagcagacgcctccagccaccaagcttaataaaagatctttatttcattagatctgtgtgtg gttttgtgtgctggggactcgagtaagggcgaattcccgataaggatctcctagagcatggcta cgtagataagtagcatggcgggtaatcattaactacaaggaaccttagtgatggagttggcca ctccctctctgcgctcgctcgctcactgaggccgggacgacaaaggtcgcccgacgcccgg gcttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgag	98
casete de expresión (promotor de 600 pb)	Tgtagttaatgattaacccgcatgctacttatctacgtagccatgctctaggaagatcggaattcg cccttaagtcatggagaagaccaccttcagatgtcctcactggggctggcagagccggcaa cctgccaaggctgctcagtcattaggagccagtagcctggaagatgtctttacccccagcatc agttcaagtggagcagcacataactcttgccctctgcctccaagattctggtgctgagacttatgg agtgtcttgagggtgcctctgcccccaacctgtcccagctggccctcccaggcctgggttgc	99

casete de expresión (promotor de 400 pb)	Tgtagttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtagccatgctctaggaagatcggaattcg cccttaagttgccttctgcccccaaccctgctcccagctggccctcccaggcctgggtgctggc ctctgctttatcaggattctcaagagggacagctggtttatgttgcactgttccctgcatatctgct ctggttttaaatagcttatctgagcagctggaggaccacatgggcttatatggcgtggggtacatgt tcctgtagccttgtccctggcacctgcaaaaatagcagccaacacccccacccccaccgccat ccccctgccccacccgtccccgtgcacattcctccctccgcagggctggctcaccaggcccc agcccacatgcctgcttaaagccctctccatcctctgcctcaccagctccccgctgagactgagc agacgcctccagccaccaagcttaataaaagatcttattttcattagatctgtgtgtgtgtgtgtgt gctggggactcgagttaagggcgaattcccgataaggatcttcttagagcatggctacgtagata agtagcatggcgggtaatcattaactaca	101
genoma viral + transgén MYBPC3 (promotor de 400 pb)	ctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggcaaagcccgggcgtcgggagacctttggt cgccccggcctcagtgagcgagcgagcgcgagagagggagtgccaactccatcactaggg gttcctttagttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtagccatgctctaggaagatcgga attcgcccttaagttgccttctgcccccaaccctgctcccagctggccctcccaggcctgggttgc tggcctctgctttatcaggattctcaagagggacagctggtttatgttgcactgttccctgcatat ctgctctggttttaaatagcttatctgagcagctggaggaccacatgggcttatatggcgtggggta catgttctgtagccttgtccctggcacctgcaaaaatagcagccaacacccccacccccacc gccatccccctgccccacccgtccccgtgcacattcctccctccgcagggctggctcaccagg cccagcccacatgcctgcttaaagccctctccatcctctgcctcaccagctccccgctgagactg agcagacgcctccagccaccatgcctgagccggggaagaagccagtctcagcttttagcaag aagccacggtcagtggaagtggccgcaggcagccctgccgtgttcgaggccgagacagagc gggcaggagtgaaggtgcgctggcagcgcgaggcagtgacatcagcgccagcaacaagt acggcctggccacagagggcacacggcatacgtgacagtgcgggaagtgggccctgccga ccagggatcttacgcagtcattgtgtgctcctccaaggtcaagttcgacctcaaggtcatagagg cagagaaggcagagcccatgctggcccctgcccctgcccctgctgaggccactggagcccct	102

ggagaagccccggccccagccgctgagctgggagaaagtgccccagtcccaaaggggtca agctcagcagctctcaatggctctacccctggagccccgatgacccattggcctctctgtgatg cgccacaggatggcgaggtgaccgtgggtggcagcatcaccttctagcccgctggccgg cgccagcctcctgaagccgcctgtggtcaagtgggtcaagggcaaatgggtggacctgagcag caaggtgggcccagcacctgcagctgcacgacagctacgaccgcccagcaaggtctatctgtt cgagctgcacatcacctgatgcccagcctgccttactggcagctaccgtgtgaggtgtccacc aaggacaaattgactgctccaacttcaatctactgtccacgaggccatgggcaccggagacc tggacctcctatcagccttccgccgcagagcctggctggaggtggctcggcgatcagtgatag ccatgaggacactgggattctggacttcagctcactgctgaaaaagagagacagttccggacc ccgaggggactcgaagctggaggcaccagcagaggaggacgtgtgggagatcctacggcag gcacccccatctgagtacgagcgcatcgcttccagtacggcgtcactgacctgcgcggcatgc taaagaggctcaagggcatgaggcgcatgagaagaagagcacagccttcagaagaagct ggagccggcctaccaggtgagcaaagggccacaagatccggctgacctggaactggctgac catgacgtgaggtcaaatggctcaagaatggccaggagatccagatgagcggcagcaagta catctttgagtccatcgggtgccaagcgtaccctgaccatcagccagtgtcattggcggacgacg cagcctaccagtgcgtgggtgggtggcgagaagtgtagcacggagctctttgtgaaagagcccc ctgtgtcatcacgcgccccttgaggaccagctgggtgatgggtggggcagcgggtggagttga gtgtgaagtatcggaggagggggcgcaagtcaaatggctgaaggacggggtggagctgacc cgggaggagacctcaaataccggttcaagaaggacgggcagagacaccacctgatcatca acgaggccatgctggaggacgcggggcactatgcactgtgcactagcgggggcccaggcgctg gctgagctcattgtgcaggaaaagaagctggaggtgtaccagagcatcgagacctgatggtg ggcgcaaaggaccaggcggtgttcaaatgtgaggtctcagatgagaatgttcggggtgtgtggc tgaagaatgggaaggagctggtgcccagacgccgataaagggtgtccacatcgggcgggtc caciaactgaccattgacgacgtcacacctgccgacgaggctgactacagctttgtcccag ggcttcgcctgcaacctgtcagccaagctccactcatggaggtcaagattgacttcgtaccag	
---	--

gcaggaacctcccaagatccacctggactgccaggccgcataccagacaccattgtggtgta gctggaaataagctacgtctggacgtccctatctctggggaccccgctcccactgtgatctggca gaaggctatcacgcaggggaataaggccccagccaggccagccccagatgccccagagga cacagggtgacagcgtgagtggtgttgacaagaagctgctgtgtgagaccgagggccgggt ccgcgtggagaccaccaaggaccgcagcatcttcacggtcgagggggcagagaaggaaga tgagggcgcttacacggtcacagtgaagaacctgtgggcgaggaccagggtcaacctcacagt caaggctatcgacgtgccagacgcacctgcggcccccaagatcagcaacgtgggagaggac tctgcacagtacagtgggagccgcctgcctacgatggcgggcagccatcctgggtacatcc tgagcgcaagaagaagaagagctaccgggtgatgcggctgaactcgacctgattcaggag ctgagtcatgaagcgggcgcatgatcagggcggtgtacgagatgcgcgtctacgcggtc aacgccatcggcatgtccaggcccagccctgcctcccagccctcatgcctatcggcccccca gccaacccaccacactggcagtagaggacgtctctgacaccacgggtctccctcaagtggcggc ccccagagcgctgggagcaggaggcctggatggctacagcgtggagtactgccagaggg ctgctcagagtgggtggctgccctgcaggggctgacagagcacacatcgatactggtgaagga cctgccacgggggcccggctgtttccgagtgcgggcacacaatatggcagggcctggagc ccctgttaccaccacggagccggtgacagtgcaggagatcctgcaacggccacggcttcagct gccaggcacctgcgccagaccattcagaagaaggtcggggagcctgtgaaccttctcatccct ttccagggcaagccccggcctcagggtgacctggaccaagaggggcagcccctggcaggcg aggaggtgagcatccgcaacagccccacagacaccatcctgttcatccgggcccgtcgccgc gtgcattcaggcacttaccagggtgacggtgcgcattgagaacatggaggacaaggccacgctg gtgctgcaggtgttgacaagccaagtctccccaggatctccgggtgactgacgcctggggtctt aatgtggctctggagtgaagccaccccaggatgtcggcaacacggaactctgggggtacac agtgcagaaagccgacaagaagaccatggagtgggtcaccgtcttgagcattaccgccgcac ccactgcgtggtgccagagctcatcattggcaatggctactactccgcgtcttcagccagaatat ggttggcttagtgacagagcggccaccaccaaggagcccgtctttatcccagaccaggcatc	
---	--

ccacaggatggcgaggtgaccgtgggtggcagcatcaccttctcagcccgcgtggccggcgcc agcctcctgaagccgcctgtggtcaagtgggtcaagggcaaattgggtggacctgagcagcaag gtgggccagcacctgcagctgcacgacagctacgaccgcgccagcaaggtctatctgttcgag ctgcacatcaccgatgcccagcctgccttactggcagctaccgctgtgaggtgtccaccaagg acaaatttgactgctccaacttcaatctcactgtccacgaggccatgggcaccggagacctgga cctcctatcagccttccgcccacgagcctggctggaggtggctggcgatcagtgatagccat gaggacactgggattctggacttcagctcactgtgaaaaagagagacagtttccggaccccg agggactcgaagctggaggcaccagcagaggaggacgtgtgggagatcctacggcaggca ccccatctgagtacgagcgcacgtccttccagtacggcgctactgacctgcgcggcatgctaa agaggctcaagggcatgaggcgcgatgagaagaagagcacagccttcagaagaagctgg agccggcctaccaggtgagcaaagggccacaagatccggctgaccgtggaactggctgacat gacgtgaggtcaaattggctcaagaatggccaggagatccagatgagcggcagcaagtacat ctttgagtccatcgggtccaagcgtaccctgacatcagccagtgtcattggcggacgacgca gcctaccagtgcgtggtgggtggcgagaagtgtagcacggagctctttgtgaaagagccccctg tgctcatcacgcgccccttgaggaccagctggtgatggtggggcagcgggtggagtttgagtgt gaagtatcggaggagggggcgcaagtcaaattggctgaaggacgggggtggagctgacctgg gaggagacctcaaataccgggttaagaaggacgggcagagacaccacctgatcatcaacg aggccatgctggaggacgcggggcactatgcactgtgcactagcgggggcccaggcgtggct gagctcattgtgcaggaaaagaagctggaggtgtaccagagcatcgcagacctgatggtgggc gcaaaggaccaggcgggtgttcaaattgaggtctcagatgagaatgttcgggggtgtgtggctga agaatgggaaggagctggtgccgacagccgcataaagggtgtccacatcgggcgggtccac aaactgaccattgacgacgtcacacctgccgacgaggctgactacagctttgtcccaggggct tcgcctgcaacctgtcagccaagctccactcatggaggtcaagattgacttcgtaccaggcag gaacctccaagatccacctggactgccaggccgcataccagacaccattgtggtgtagctg gaaataagctacgtctggacgtccctatctctggggaccccgctccactgtgatctggcagaag	
--	--

gctatcacgcaggggaataaggccccagccaggccagcccagatgcccagaggacaca ggtgacagc gatgagtggtgtttgacaagaagctgctgtgtgagaccgagggccgggtccgc gtggagaccaccaaggaccgcagcatcttcacggctcgagggggcagagaaggaagatgag ggcgtctacacgggtcacagtgaagaacctgtgggagaggaccaggtcaacctcacagtcaa ggtcatcgacgtgccagacgcacctgcgcccccaagatcagcaacgtgggagaggactcct gcacagtacagtgggagccgctgcctacgatggcgggcagccatcctgggtacatcctgg agcgcaagaagaagaagagctaccggtggatgcggctgaactcgacctgattcaggagctg agtcataagcgcgccgcatgatcgagggcggtgtgtacgagatgcgctctacgcggtcaac gccatcggtatgtccaggcccagccctgcctcccagcccttcctgcctatcggtccccccagcg aaccacccacctggcagtagaggacgtctctgacaccacgggtctccctcaagtggcgggccc cagagcgcggtgggagcaggaggcctggatggctacagcggtggagtactgccagagggctg ctcagagtgggtggctgccctgcaggggctgacagagcacacatcgatactggtgaaggacct ggccacggggggcccggtgctttccgagtgcgggcacacaatatggcagggcctggagcccc tgttaccaccacggagccggtgacagtgcaggagatcctgcaacggccacggcttcagctgcc caggcacctgcgccagaccattcagaagaaggtcggggagcctgtgaaccttctatcccttcc agggcaagccccggcctcaggtgacctggaccaaagaggggcagcccctggcaggcgagg aggtgagcatccgcaacagccccacagacaccatcctgttcatccgggcccgtcgccgctgc attcaggcacttaccaggtgacggtgcgcattgagaacatggaggacaaggccacgctggtgc tgcaggtgttgacaagccaagtcctcccaggatctccgggtgactgacgcctggggcttaatg tggctctggagtgaagccaccccaggatgtcggaacacggaactctgggggtacacagtgc agaaagccgacaagaagaccatggagtgggtcaccgctcttgagcattaccgcccacccact gcgtggtgccagagctcatcattggcaatggctactactccgctcttcagccagaatatggttg cttagtgacagagcggccaccaccaaggagcccgtctttatcccagaccaggcatcacctat gagccacccaactataaggccctggacttctccgaggccccaagcttcacccagcccctggtg aaccgctcggtcatcggggtacactgctatgctctgtgtgtgtccggggtagccccaagcc	
---	--

	caagatttctggttcaagaatggcctggacctgggagaagacgcccgttccgcatgttcagca agcagggagtggtgactctggagattagaaagccctgccccttgacgggggcatctatgtctgc agggccaccaacttacagggcgaggcacggtgtgagtgccgctggaggtgcgagtgccca gtaaagcttaataaaagatctttattttcattagatctgtgtgtggtttttgtgtgctggggactcgagtt aaggcggaattcccgataaggatcttctagagcatggctacgtagataagtagcatggcggtt aatcattaactaca	
Segmento 5': genoma viral parcial (promotor de 400 pb)	Tgtagttaatgattaacccgccatgctacttatctacgtagccatgctctaggaagatcggaattcg cccttaagttgccttctgcccccaaccctgctccagctggccctccaggcctgggttgctggc ctctgctttatcaggattctcaagaggacagctggtttatgttgcagactgttcctgcatactctgt ctggttttaaatagcttatctgagcagctggaggaccacatgggcttatatggcgtggggtacatgt tcctgtagcctgtccctggcacctgccaaaatagcagccaacacccccacccccaccgcat ccccctgccccacccgtcccctgtgcacattcctccctccgcagggctggctcaccaggcccc agcccacatgcctgcttaagccctctccatcctctgcctcaccagtcctcgctgagactgagc agacgcctccagccacc	93
Segmento 3': genoma viral parcial	Agcttaataaaaagatctttattttcattagatctgtgtgtggtttttgtgtgctggggactcgagttaag ggcgaattcccgataaggatcttctagagcatggctacgtagataagtagcatggcggttaat cattaactaca	94

En algunos aspectos de la descripción, un virión de rAAV se usa para suministrar los casetes de expresión descritos en la presente descripción a células cardíacas de un sujeto, *por ejemplo*, para tratar la miocardiopatía. En consecuencia, la descripción proporciona un virión de rAAV, el virión de rAAV que comprende una cápside de AAV y un casete de expresión que comprende un polinucleótido que codifica un transgén enlazado operativamente a un promotor.

Los viriones de rAAV de la descripción comprenden una proteína de la cápside. Las proteínas de la cápside son proteínas estructurales que conforman el empaque icosaédrico ensamblado del virión de rAAV que contiene el casete de expresión. Las proteínas de la cápside se clasifican por serotipo. Los serotipos de cápside de tipo silvestre en viriones de rAAV pueden ser, por ejemplo,

AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 o AAV12 (Naso y otros *BioDrugs* 31:317–334 (2017)). Los tipos de cápsides diseñadas incluyen cápsides quiméricas y cápsides de mosaico (Choi y otros *Curr Gene Ther.* 5: 299–310 (2005)). Las cápsides se seleccionan para los viriones de rAAV en función de su capacidad para transducir
 5 tejidos o tipos de células específicos (Liu y otros *Curr Pharm Des.* 21:3248-56 (2015)).

Puede usarse cualquier proteína de la cápside que pueda facilitar la transducción del virión de rAAV en células cardíacas para el suministro de un transgén, como se describió en la presente descripción. Las proteínas de la cápside usadas en los viriones de rAAV para el suministro de transgenes a células cardíacas que dan como resultado una alta expresión pueden ser, por
 10 ejemplo, AAV4, AAV6, AAV7, AAV8 y AAV9 (Zincarelli y otros *Mol. Ther.* 16:P1073-1080 (2008)).

Las cápsides artificiales, tales como las cápsides quiméricas generadas a través de bibliotecas combinatorias, también pueden usarse para el suministro de transgenes a células cardíacas que resultan en alta expresión (véase el documento US 63/012.703, cuyos contenidos se incorporan en la presente descripción como referencia). Otras proteínas de la cápside con diversas

15 características también pueden usarse en los viriones de rAAV de la descripción. Los vectores y las cápsides de AAV se proporcionan en las patentes de Estados Unidos Pub. Núm. US10011640B2; US7892809B2, US8632764B2, US8889641B2, US9475845B2, US10889833B2, US10480011B2 y US10894949B2, cuyos contenidos se incorporan en la presente descripción como referencia; y las patentes internacionales Pub. Núm.
 20 WO2020198737A1, WO2019028306A2, WO2016054554A1, WO2018152333A1, WO2017106236A1, WO2008124724A1, WO2017212019A1, WO2020117898A1, WO2017192750A1, WO2020191300A1 y WO2017100671A1, cuyos contenidos se incorporan en la presente descripción como referencia.

En algunas modalidades, los viriones de rAAV de la descripción comprenden una proteína de la
 25 cápside modificada genéticamente. Las proteínas de la cápside modificadas genéticamente pueden derivarse de una cápside parental, *por ejemplo*, de tipo silvestre e incluyen, *por ejemplo*,

una secuencia de polipéptidos variante con respecto a una secuencia de la cápside parental en uno o más sitios. Por ejemplo, los sitios variantes de la cápside parental pueden ocurrir en el sitio VR-IV, sitio VR-V, sitio VR-VII y/o sitio VR-VIII (véase, *por ejemplo*, Büning y Srivastava. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 12:248-265 (2019)).

- 5 En algunas modalidades, la proteína de la cápside es una proteína de la cápside quimérica de AAV5/AAV9. En algunas modalidades, la proteína de la cápside quimérica comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más segmentos de polipéptidos que se derivan de la proteína de la cápside de AAV5 (SEQ ID NO 144). En algunas modalidades, la proteína de la cápside quimérica comprende al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más segmentos de polipéptidos que se derivan de la proteína de la cápside de AAV9 (SEQ ID NO 143). En algunas modalidades, al menos un segmento de polipéptido se deriva de la proteína de la cápside de AAV5 y al menos un segmento de polipéptido se deriva de la proteína de la cápside de AAV9.

- En algunas modalidades, la proteína de la cápside es una proteína de la cápside combinada. Como se usa en la presente descripción, “proteína de la cápside combinada” se refiere a una proteína de la cápside quimérica de AAV5/AAV9, que comprende además variaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia parental quimérica en uno o más sitios. En algunas modalidades, el uno o más sitios de la secuencia parental quimérica se seleccionan de los equivalentes al sitio VR-IV, al sitio VR-V, al sitio VR-VII y al sitio VR-VIII de la proteína de la cápside de AAV9.

- 20 En algunas modalidades, los viriones de rAAV comprenden una proteína de la cápside modificada genéticamente seleccionada de la tabla 6.

Tabla 6. Proteínas de la cápside modificadas genéticamente

Cápside modificada genéticamente	SEQ ID NO
CR9-01	145
CR9-07	146
CR9-08	147
CR9-09	148
CR9-10	149
CR9-11	150
CR9-13	151
CR9-14	152
CR9-15	153
CR9-16	154
CR9-17	155
CR9-20	156
CR9-21	157
CR9-22	158
ZC23	159
ZC24	160
ZC25	161
ZC26	162
ZC27	163
ZC28	164
ZC29	165
ZC30	166

Cápside modificada genéticamente	SEQ ID NO
ZC31	167
ZC32	168
ZC33	169
ZC34	170
ZC35	171
ZC40	172
ZC41	173
ZC42	174
ZC43	175
ZC44	176
ZC45	177
ZC46	178
ZC47	179
ZC48	180
ZC49	181
ZC50	182
TN47-07	183
TN47-10	184
TN47-13	185
TN47-14	186
TN47-17	187
TN47-22	188

Cápside modificada genéticamente	SEQ ID NO
TN40-07	189
TN40-10	190
TN40-13	191
TN40-14	192
TN40-17	193
TN40-22	194

Cápside modificada genéticamente	SEQ ID NO
TN44-07	195
TN44-10	196
TN44-13	197
TN44-14	198
TN44-17	199
TN44-22	200

En algunas modalidades, el rAAV es una replicación defectuosa, en que el virión de rAAV no puede replicar y empaquetar además independientemente su genoma. Por ejemplo, cuando una célula cardíaca está dirigida con viriones de rAAV, el transgén se expresa en la célula cardíaca diana; sin embargo, debido al hecho de que la célula cardíaca diana carece de genes rep y cap de AAV y de genes de función accesoria, el rAAV no puede replicarse.

En algunas modalidades, los viriones de rAAV de la presente descripción que encapsulan los casetes de expresión como se describen en la presente descripción, pueden producirse mediante el uso de producción sin cooperadores. Los rAAV son virus deficientes en replicación y normalmente requieren componentes de un virus cooperador vivo, tal como el adenovirus, en una célula hospedera para el empaque de los viriones de rAAV infecciosos. Los sistemas de producción sin cooperadores de rAAV permiten la producción de viriones de rAAV infecciosos sin el uso de un virus cooperador vivo. En el sistema sin cooperadores, una línea celular de empaquetamiento del hospedero se cotransfecta con tres plásmidos. Un primer plásmido puede contener productos génicos de adenovirus (*por ejemplo*, genes de ARN E2A, E4 y VA) necesarios para el empaque de viriones de rAAV. Un segundo plásmido puede contener genes de AAV

requeridos (por ejemplo, genes REP y CAP). Un tercer plásmido contiene la secuencia polinucleotídica que codifica el transgén de interés y un promotor flanqueado por las ITR. Una línea celular de empaquetamiento del hospedero puede ser, por ejemplo, células hospederas de AAV-293. Las células hospederas adecuadas contienen componentes adicionales necesarios para el empaquetamiento de viriones de rAAV infecciosos que no son suministrados por los plásmidos. En algunas modalidades, los genes CAP pueden codificar, por ejemplo, proteínas de la cápside de AAV como se describió en la presente descripción.

IV. Métodos de tratamiento

La presente descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los genomas de vectores de rAAV o viriones de rAAV descritos en la presente descripción y uno o más portadores, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. En modalidades particulares, la composición farmacéutica comprende un genoma de vector de rAAV o virión de rAAV como se describe en la presente descripción, que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína terapéutica o ácido nucleico, enlazado operativamente a un promotor específico cardíaco (*por ejemplo*, un promotor de TNNT2 modificado). Por ejemplo, en algunas modalidades, la composición farmacéutica es un vector de AAV9 que comprende el promotor de TNNT2 cardíaco modificado (SEQ ID NO 3) enlazado operativamente a la proteína MYBPC3 (SEQ ID NO 86). Se proporcionan composiciones farmacéuticas, *p. ej.*, para su uso en la prevención o el tratamiento de la miocardiopatía, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína terapéutica o ácido nucleico que puede restaurar la función contráctil en el corazón.

La descripción proporciona métodos para expresar un polinucleótido una célula. El método puede comprender, por ejemplo, transducir una célula diana con los viriones de rAAV, genomas de vectores de rAAV, o casetes de expresión descritos en la presente descripción. Una célula diana

puede ser, por ejemplo y sin limitación, una célula cardíaca, una célula muscular, un cardiomiocito derivado de células madre pluripotentes inducido (iPSC-CM), un cardiomiocito, o un *MYBPC3*^{-/-} iPSC-CM. En un aspecto, un método para expresar una proteína MYBPC3 en una célula comprende transducir una célula diana o población de células diana con un virión de rAAV o genomas de vector de rAAV descritos en la presente descripción. En una modalidad, la célula es una célula *MYBPC3*^{-/-}. En una modalidad, la célula comprende una mutación inactivante en una o ambas copias del gen *MYBPC3* endógeno.

Las composiciones que se describen en la presente descripción pueden emplearse en un método para tratar a un sujeto con una enfermedad o afección cardíaca. “Tratar” o el “tratamiento de una afección o sujeto que lo necesita” se refiere a (1) tomar medidas para obtener resultados beneficiosos o deseados, que incluyen resultados clínicos tales como la reducción de los síntomas; (2) prevenir la enfermedad, por ejemplo, provocar que los síntomas clínicos de la enfermedad no se desarrollen en un paciente que puede estar predispuesto a la enfermedad, pero que aún no experimenta ni muestra síntomas de la enfermedad; (3) inhibir la enfermedad, por ejemplo, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas clínicos; (4) aliviar la enfermedad, por ejemplo, provocar la regresión de la enfermedad o sus síntomas clínicos; o (5) retrasar la enfermedad. A los fines de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, de modo no taxativo, promover la contracción del sarcómero cardíaco.

Los sujetos que necesitan tratamiento mediante el uso de las composiciones y métodos de la presente descripción incluyen, de modo no taxativo, individuos que tienen un defecto cardíaco congénito, individuos que sufren de una enfermedad muscular degenerativa, individuos que sufren de una afección que resulta en tejido cardíaco isquémico (*por ejemplo*, individuos con enfermedad de la arteria coronaria), y similares. En algunos ejemplos, un método es útil para tratar una enfermedad o afección muscular degenerativa (*p. ej.*, miocardiopatía familiar, miocardiopatía dilatada, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía restrictiva, o enfermedad de la arteria coronaria con miocardiopatía isquémica resultante). En algunos ejemplos, un método

de sujeto es útil para tratar a individuos que tienen una enfermedad o trastorno cardíaco o cardiovascular, por ejemplo, enfermedad cardiovascular, aneurisma, angina de pecho, arritmia, aterosclerosis, accidente cerebrovascular (accidente cerebrovascular), enfermedad cerebrovascular, cardiopatía congénita, insuficiencia cardíaca congestiva, miocarditis, 5 valvulopatía coronaria, enfermedad arterial dilatada, disfunción diastólica, endocarditis, presión arterial alta (hipertensión), miocardiopatía, miocardiopatía hipertrófica, miocardiopatía restrictiva, enfermedad de las arterias coronarias con miocardiopatías isquémicas resultantes, prolapso de la válvula mitral, infarto de miocardio (ataque cardíaco), o tromboembolia venosa. En algunos ejemplos, el sujeto padece o está en riesgo de miocardiopatía.

10 En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para la prevención y/o tratamiento de miocardiopatías en un sujeto. En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar miocardiopatías afiliadas con mutaciones en la proteína C de unión a miosina cardíaca (MYBPC3), tales como miocardiopatía hipertrófica y miocardiopatía hipertrófica familiar. La 15 miocardiopatía tratada por las composiciones y métodos descritos en la presente descripción también puede incluir miocardiopatías asociadas con un émbolo pulmonar, una trombosis venosa, un infarto de miocardio, un ataque isquémico transitorio, un trastorno vascular periférico, aterosclerosis, enfermedad cardíaca isquémica y/u otra lesión miocárdica o enfermedad vascular. En determinadas modalidades, las miocardiopatías tratadas por las composiciones y métodos 20 descritos en la presente descripción pueden incluir enfermedades cardíacas asociadas con la hipercontractilidad del tejido miocárdico, tal como insuficiencia cardíaca relacionada con la hipercontractilidad ventricular izquierda.

En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción pueden inducir la expresión detectable de una proteína terapéutica o ácido nucleico (*p. ej.*, 25 proteína MYBPC3) o un mutante, variante, o fragmento de estos, para modular la función contráctil del tejido miocárdico en un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, la cantidad,

concentración, y volumen de la composición que modula la función contráctil en el tejido miocárdico administrado a un sujeto puede controlarse y/u optimizarse para mejorar sustancialmente los parámetros funcionales del corazón mientras mitiga los efectos secundarios adversos.

- 5 La cantidad de la composición que modula la función contráctil administrada al tejido miocárdico también puede ser una cantidad requerida para dar como resultado la expresión detectable de una proteína terapéutica o ácido nucleico (*p. ej.*, proteína MYBPC3) o un mutante, variante, o fragmento de estos en el corazón; preservar y/o mejorar la función contráctil; retrasar la aparición de miocardiopatía o revertir el curso patológico de la enfermedad; aumentar la viabilidad de los
- 10 miocitos; mejorar la función de miofilamento; inhibir la hipertrofia ventricular izquierda; regresión de la hipertrofia cardíaca, normalizar la actividad sistólica y diastólica en el corazón; y restaurar el comportamiento normal de puentes cruzados a nivel de miofilamento.

- En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción dan como resultado la expresión detectable de la proteína MYBPC3, o un mutante, variante, o
- 15 fragmento de esta, en una célula cardíaca del sujeto que está siendo tratado. En algunas modalidades, la administración de un genoma del vector de rAAV o virión de rAAV descrito en la presente descripción provoca la expresión específica de la proteína MYBPC3 en el corazón del sujeto. En algunas modalidades, la administración del genoma del vector rAAV o del virión rAAV descrito en la presente descripción provoca una expresión baja o indetectable de MYBPC3 en el
- 20 tejido esquelético, el cerebro y/o el hígado del sujeto, en donde opcionalmente el sujeto padece o está en riesgo de miocardiopatía.

En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción dan como resultado la expresión detectable de la proteína KCNH2, o un mutante, variante, o fragmento de esta, en una célula cardíaca del sujeto que está siendo tratado.

En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción dan como resultado la expresión detectable de la proteína TRPM4, o un mutante, variante, o fragmento de esta, en una célula cardíaca del sujeto que está siendo tratado.

En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción dan como resultado la expresión detectable de la proteína DSG2, o un mutante, variante, o fragmento de esta, en una célula cardíaca del sujeto que está siendo tratado.

En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción dan como resultado la expresión detectable de la proteína ATP2A2, o un mutante, variante, o fragmento de esta, en una célula cardíaca del sujeto que está siendo tratado.

En algunas modalidades, las composiciones y métodos descritos en la presente descripción dan como resultado la expresión detectable de CACNA1C, DMD, DMPK, EPG5, EVC, EVC2, FBN1, NF1, SCN5A, SOS1, NPR1, ERBB4, VIP, o MYH7, o un mutante, variante, o fragmento de estos, en una célula cardíaca del sujeto que se está tratando.

“Expresión detectable” se refiere típicamente a la expresión de al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %

o más en comparación con un sujeto de control o tejido no tratado con el vector. En algunas modalidades, la expresión detectable significa expresión en 1.5 veces, 2 veces, 2.5 veces o 3 veces mayor que un control sin vector. La expresión puede evaluarse mediante inmunoelectrotransferencia, como se describe en el ejemplo que sigue o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) u otros métodos conocidos en la técnica. En algunos casos, la expresión se mide cuantitativamente mediante el uso de una curva estándar. Las curvas estándar pueden generarse mediante el uso de proteína purificada, *por ejemplo*, proteína MYBPC3 purificada, mediante los métodos descritos en los ejemplos o conocidos en la técnica. Alternativamente, la expresión del producto génico terapéutico puede evaluarse mediante la cuantificación del ARNm correspondiente.

En algunas modalidades, la expresión detectable del producto génico terapéutico en el tejido cardíaco se produce a dosis, en genomas de vector (vg) por kilogramo de peso del sujeto (kg),

de 3×10^{14} vg/kg o menos, 2×10^{14} vg/kg o menos, 1×10^{14} vg/kg o menos, 9×10^{13} vg/kg o menos, 8×10^{13} vg/kg o menos, 7×10^{13} vg/kg o menos, 6×10^{13} vg/kg o menos, 5×10^{13} vg/kg o menos, 4×10^{13} vg/kg o menos, 3×10^{13} vg/kg o menos, 2×10^{13} vg/kg o menos o 1×10^{13} vg/kg o menos.

En varias modalidades, las composiciones descritas en la presente descripción contienen los viriones o genomas de vectores de rAAV descritos en la presente descripción y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden incluir vehículos (*por ejemplo*, portadores, diluyentes y excipientes) que son farmacéuticamente aceptables para una formulación capaz de inyectarse. Estas pueden ser en particular soluciones isotónicas, estériles, salinas (fosfato monosódico o disódico, cloruro de sodio, potasio, calcio o magnesio y similares o mezclas de dichas sales) o composiciones secas, especialmente liofilizadas que tras la adición, en dependencia del caso, de agua esterilizada o solución salina fisiológica, permiten la constitución de soluciones inyectables. Las formas farmacéuticas ilustrativas adecuadas para el uso inyectable incluyen, por ejemplo, soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de maní o propilenglicol acuoso; y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles.

En diversas modalidades, las composiciones farmacéuticas de la descripción comprenden aproximadamente 1×10^8 copias del genoma por mililitro (GC/ml), aproximadamente 5×10^8 GC/ml, aproximadamente 1×10^9 GC/ml, aproximadamente 5×10^9 GC/ml, aproximadamente 1×10^{10} GC/ml, aproximadamente 5×10^{10} GC/ml, aproximadamente 1×10^{11} GC/ml, aproximadamente 5×10^{11} GC/ml, aproximadamente 1×10^{12} GC/ml, aproximadamente 5×10^{12} GC/ml, aproximadamente 5×10^{13} GC/ml, aproximadamente 1×10^{14} GC/ml o aproximadamente 5×10^{14} GC/ml del vector viral (*por ejemplo*, virión de rAAV).

En diversas modalidades, las composiciones farmacéuticas de la descripción comprenden aproximadamente 1×10^8 genomas virales por mililitro (vg/ml), aproximadamente 5×10^8 vg/ml, aproximadamente 1×10^9 vg/ml, aproximadamente 5×10^9 vg/ml, aproximadamente 1×10^{10} vg/ml,

aproximadamente 5×10^{10} vg/ml, aproximadamente 1×10^{11} vg/ml, aproximadamente 5×10^{11} vg/ml, aproximadamente 1×10^{12} vg/ml, aproximadamente 5×10^{12} vg/ml, aproximadamente 5×10^{13} vg/ml, aproximadamente 1×10^{14} vg/ml o aproximadamente 5×10^{14} vg/ml del vector viral (*por ejemplo*, virión de rAAV).

- 5 En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas de la descripción se administran en un volumen total de aproximadamente 1 ml, 5 ml, 10 ml, aproximadamente 20 ml, aproximadamente 25 ml, aproximadamente 30 ml, aproximadamente 35 ml, aproximadamente 40 ml, aproximadamente 45 ml, aproximadamente 50 ml, aproximadamente 55 ml, aproximadamente 60 ml, 65 ml, aproximadamente 70 ml, aproximadamente 75 ml,
- 10 aproximadamente 80 ml, aproximadamente 85 ml, aproximadamente 90 ml, aproximadamente 95 ml, aproximadamente 100 ml, aproximadamente 105 ml, aproximadamente 110 ml, aproximadamente 115 ml, aproximadamente 120 ml, aproximadamente 125 ml, aproximadamente 130 ml, aproximadamente 135 ml, aproximadamente 140 ml, aproximadamente 145 ml, aproximadamente 150 ml, aproximadamente 155 ml,
- 15 aproximadamente 160 ml, aproximadamente 165 ml, aproximadamente 170 ml, aproximadamente 175 ml, aproximadamente 180 ml, aproximadamente 185 ml, aproximadamente 190 ml, aproximadamente 200 ml, aproximadamente 205 ml, aproximadamente 210 ml, aproximadamente 215 ml o aproximadamente 220 ml.

- En algunas modalidades, los métodos de la descripción comprenden administrar un virión de
- 20 rAAV que codifica MYBPC3 a una dosis de aproximadamente 1×10^8 copias del genoma por mililitro (GC/ml), aproximadamente 5×10^8 GC/ml, aproximadamente 1×10^9 GC/ml, aproximadamente 5×10^9 GC/ml, aproximadamente 1×10^{10} GC/ml, aproximadamente 5×10^{10} GC/ml, aproximadamente 1×10^{11} GC/ml, aproximadamente 5×10^{11} GC/ml, aproximadamente 1×10^{12} GC/ml, aproximadamente 5×10^{12} GC/ml, aproximadamente 5×10^{13} GC/ml,
- 25 aproximadamente 1×10^{14} GC/ml, o aproximadamente 5×10^{14} GC/ml del virión de rAAV.

En modalidades preferidas, los métodos de la descripción comprenden administrar por vía intravenosa un virión de rAAV que codifica MYBPC3 a una dosis de aproximadamente 3×10^{12} GC/ml, aproximadamente 3×10^{13} GC/ml, aproximadamente 1×10^{14} GC/ml, o aproximadamente 3×10^{14} GC/ml del virión de rAAV.

- 5 En modalidades preferidas, los métodos de la descripción comprenden administrar, mediante suministro localizado al corazón, un virión de rAAV que codifica MYBPC3 a una dosis de aproximadamente 3×10^{11} GC/ml, aproximadamente 3×10^{12} GC/ml, aproximadamente 1×10^{13} GC/ml, o aproximadamente 3×10^{13} GC/ml del virión de rAAV.

- 10 En algunas modalidades, los métodos de la descripción comprenden administrar un virión de rAAV que codifica MYBPC3 a una dosis de aproximadamente 1×10^8 genomas virales por mililitro (vg/ml), aproximadamente 5×10^8 vg/ml, aproximadamente 1×10^9 vg/ml, aproximadamente 5×10^9 vg/ml, aproximadamente 1×10^{10} vg/ml, aproximadamente 5×10^{10} vg/ml, aproximadamente 1×10^{11} vg/ml, aproximadamente 5×10^{11} vg/ml, aproximadamente 1×10^{12} vg/ml, aproximadamente 5×10^{12} vg/ml, aproximadamente 5×10^{13} vg/ml, aproximadamente 1×10^{14} vg/ml, o aproximadamente
15 5×10^{14} vg/ml del virión de rAAV.

En modalidades preferidas, los métodos de la descripción comprenden administrar por vía intravenosa un virión de rAAV que codifica MYBPC3 a una dosis de aproximadamente 3×10^{12} vg/ml, aproximadamente 3×10^{13} vg/ml, aproximadamente 1×10^{14} vg/ml, o aproximadamente 3×10^{14} vg/ml del virión de rAAV.

- 20 En modalidades preferidas, los métodos de la descripción comprenden administrar, mediante suministro localizado al corazón, un virión de rAAV que codifica MYBPC3 a una dosis de aproximadamente 3×10^{11} vg/ml, aproximadamente 3×10^{12} vg/ml, aproximadamente 1×10^{13} vg/ml, o aproximadamente 3×10^{13} vg/ml del virión de rAAV.

- 25 Las copias del genoma por mililitro pueden determinarse mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) mediante el uso de una curva estándar generada con una muestra de referencia que tiene una concentración conocida del genoma del polinucleótido del virus. Para

el AAV, la muestra de referencia usada es a menudo el plásmido de transferencia usado en la generación del virión de rAAV, pero pueden usarse otras muestras de referencia.

Alternativa o adicionalmente, la concentración de un vector viral puede determinarse al medir el título del vector en una línea celular. El título vírico se expresa típicamente como partículas víricas

5 (vp) por unidad de volumen (por ejemplo, vp/ml). En diversas modalidades, las composiciones farmacéuticas de la descripción comprenden aproximadamente 1×10^8 partículas víricas por mililitro (vp/ml), aproximadamente 5×10^8 vp/ml, aproximadamente 1×10^9 vp/ml, aproximadamente 5×10^9 vp/ml, aproximadamente 1×10^{10} vp/ml, aproximadamente 5×10^{10} vp/ml, aproximadamente 1×10^{11} vp/ml, aproximadamente 5×10^{11} vp/ml, aproximadamente 1×10^{12} vp/ml, aproximadamente
10 5×10^{12} vp/ml, aproximadamente 5×10^{13} vp/ml o aproximadamente 1×10^{14} vp/ml o aproximadamente 5×10^{14} del vector viral (por ejemplo, virión de rAAV).

En una modalidad, la presente descripción proporciona un estuche que comprende un contenedor que aloja una composición farmacéutica como se describió en la presente descripción.

Los viriones o genomas de vectores de rAAV de la presente descripción pueden administrarse a

15 un sujeto que lo necesita mediante aplicación sistémica, *por ejemplo*, mediante suministro intravenoso, intraarterial o intraperitoneal de un vector en analogía con lo que se ha mostrado en modelos animales (Katz et al., 2012, *Gene Ther.* 19:659-669. En algunas modalidades, los viriones o genomas de vectores de rAAV de la presente descripción tratan o previenen la miocardiopatía hipertrófica, en donde el vector se administra sistémicamente.

20 En algunas modalidades, los viriones o genomas de vectores de rAAV de la presente descripción pueden administrarse mediante administración directa al tejido cardíaco, *p. ej.*, mediante administración intracoronaria. En algunas modalidades, los vectores se administran como una dosis única mediante infusión en la arteria coronaria epicárdica anterógrada durante un período de 10 minutos en un laboratorio de cateterismo cardíaco después de la angiografía (suministro
25 intracoronario percutáneo sin oclusión del balón vascular) con el uso de catéteres de diagnóstico o guía 5F o 6F estándar (Jaski et al., 2009, *J Card Fail.* 15: 171-181).

Los sujetos que son adecuados para el tratamiento mediante el uso de las composiciones, composiciones y métodos de la presente descripción incluyen individuos (*p. ej.*, sujetos mamíferos, tales como seres humanos, primates no humanos, mamíferos domésticos, sujetos mamíferos no humanos experimentales tales como ratones, ratas, etc.) que tienen una afección

5 cardíaca.

En algunas modalidades, los viriones o genomas de vectores de rAAV de la presente descripción pueden usarse para tratar a un sujeto que lo necesita. En algunas modalidades, el vector viral puede administrarse al sujeto que necesita tratar una enfermedad cardiovascular. En algunas modalidades, los viriones o genomas de vectores de rAAV se administran a un sujeto para tratar

10 la miocardiopatía. En algunas modalidades, el vector viral se administra sistémicamente. En otras modalidades, el vector viral se administra mediante administración directa al tejido cardíaco.

Los viriones o genomas de vectores de rAAV pueden administrarse por varias vías, que incluyen, entre otras, la inyección directa en el corazón o el cateterismo cardíaco. En una modalidad preferida, una composición farmacéutica que comprende un virión de rAAV que codifica MYBPC3

15 se administra mediante suministro de catéter intracardíaco mediante infusión en el seno coronario retrógrado (RCSI). Alternativamente, el vector viral puede administrarse sistémicamente tal como mediante infusión intravenosa. Cuando se utiliza la inyección directa, se puede realizar mediante cirugía a corazón abierto o cirugía mínimamente invasiva. En algunos casos, el vector viral se administra al espacio pericárdico mediante inyección o infusión.

20 El vector viral administrado al sujeto puede rastrearse mediante una variedad de métodos. Por ejemplo, pueden detectarse fácilmente virus recombinantes etiquetados con o que expresan un marcador (tal como proteína verde fluorescente, o beta-galactosidasa). Los virus recombinantes pueden modificarse genéticamente para hacer que la célula diana exprese una proteína marcadora, tal como una proteína expresada en superficie o una proteína fluorescente.

25 Alternativamente, la infección de células diana con virus recombinantes puede detectarse por su expresión de un marcador celular que no se expresa por el animal empleado para las pruebas

(por ejemplo, un antígeno específico humano cuando se inyectan células en un animal experimental). La presencia y el fenotipo de las células diana pueden evaluarse mediante microscopía fluorescente (*p. ej.*, para proteína fluorescente verde, o beta-galactosidasa), mediante inmunohistoquímica (*p. ej.*, mediante el uso de un anticuerpo contra un antígeno humano), mediante ELISA (mediante el uso de un anticuerpo contra un antígeno humano), o mediante análisis de RT-PCR utilizando cebadores y condiciones de hibridación que hacen que la amplificación sea específica para el ARN indicativo de un fenotipo cardíaco.

Todas las patentes, publicaciones de patentes y otras publicaciones mencionadas e identificadas en la presente descripción se incorporan de manera individual y expresa en la presente descripción mediante referencia en su totalidad para todos los propósitos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Diseño del genoma del vector para cargas grandes

El propósito de este estudio fue evaluar un vector que tenía delecciones en porciones no codificantes del vector a un vector parental. Demuestra que, sorprendentemente, la delección en regiones no codificantes aumenta la potencia del vector.

Con dos secuencias de ITR flanqueantes intactas (cada una ~130 pb), promotor, intrón, WPRE y señal de poliadenilación, y secuencias reguladoras *cis* estándar para la expresión óptima del transgén, los genomas de vectores de AAV típicos requieren aproximadamente 1.8-2.0 kpb de secuencia de ADN no codificante. Los transgenes de aproximadamente 3.0 kpb o más, como el transgén MYBPC3 de 3.8 kpb, hacen que el genoma del vector supere los 5.0 kpb. Por ejemplo, Mearini et al., *Nat Commun* 5:5515 (2014) informa un vector de AAV que codifica MYBPC3 que tiene un tamaño de genoma de vector de 5.4 kpb. Sin secuencias de ITR, esto es aproximadamente 5.2 kpb.

Se generó un sistema indicador para evaluar si un vector de AAV toleraría regiones no codificantes acortadas. Se modificó un vector de AAV convencional que tiene un promotor CAG,

intrón, WPRE, y una secuencia de poliA estándar para eliminar el WPRE (589 pb) y para acortar la secuencia de poliA (retirando 170 pb) (**Figura 1A**). La expresión de un indicador de GFP clonado en el sitio de clonación múltiple (MCS) se mantuvo, pero disminuyó ligeramente cuando estos elementos del vector se eliminaron o acortaron (**Figura 1B**). El vector se truncó además por la delección del intrón y una porción de la secuencia 3' a la 5' ITR (**Figura 1C**). El genoma del vector final fue de aproximadamente 1.1 kpb (0.8 kpb sin ITR).

Ejemplo 2: Expresión del transgén MYBPC3 en cardiomiocitos inducidos in vitro

El propósito de este estudio fue proporcionar un promotor específico del tejido mejorado para la expresión de un producto génico terapéutico en cardiomiocitos inducidos *in vitro* mediante el uso de un sistema de vector basado en AAV. Las células madre pluripotentes inducidas por seres humanos (iPSC) se diferenciaron en cardiomiocitos mediante el uso de inducción mesodérmica, especificación cardíaca y selección metabólica como se describió anteriormente (Tohyama et al. *Cell Stem Cell*. 2013;12(1):127-37; Lian et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(27):E1848-57; Burridge PW, Holmstrom A, Wu JC. *Curr Protoc Hum Genet*. 2015;87:21 3 1-15). Las transducciones víricas de iPSC-CM se realizaron con AAV6 en las multiplicidades de infección indicadas.

Los casetes de expresión génica ilustrados en la **Figura 2A** se construyeron para un sistema de vector basado en AAV para el tratamiento de la miocardiopatía. El vector de AAV, basado en el vector representado en la **Figura 1C**, comprendió varios elementos reguladores *cis*, que incluyen dos repeticiones terminales invertidas (ITR, 260 pb cada una), una señal de poliadenilación (A, 49 pb), y un promotor de longitud completa (SEQ ID NO 1) o de troponina cardíaca modificada T (TNNT2) (SEQ ID NO 2-4). No se incluyó WPRE, y la señal de poliA y la secuencia 3' a la 5' ITR se acortaron. Los promotores de TNNT2 modificados contenían delecciones de 100-200 pb en el extremo 5' (corriente arriba) del promotor de TNNT2 de tipo silvestre. La proteína C de unión a miosina humana (MYBPC3, SEQ ID NO 86) con una longitud de secuencia de polinucleótidos de 3.825 kb se evaluó como el producto génico terapéutico en cardiomiocitos derivados de iPSC.

Para determinar si los promotores de TNNT2 de tipo silvestre o modificados podrían inducir la expresión detectable de la proteína MYBPC3, los cardiomiocitos derivados de iPSC *MYBPC3*^{-/-} se transdujeron con partículas de AAV6 a 6×10⁴ MOI. Las células se analizaron para determinar la expresión de la proteína MYBPC3 mediante inmunofluorescencia o inmunoelectrotransferencia

5 5-15 días después de la infección.

La **Figura 2B** muestra que el vector de AAV que comprende el promotor de TNNT2 de tipo silvestre (SEQ ID NO 1) impulsa la expresión de la proteína MYBPC3 en los sarcómeros de cardiomiocitos derivados de iPSC *MYBPC3*^{-/-}.

La **Figura 3A – Figura 3C** muestra que el vector de AAV que comprende el promotor de TNNT2 modificado de 400 pb (SEQ ID NO 3) impulsa una expresión de proteína MYBPC3 más alta que los promotores de 600 pb de TNNT2 de tipo silvestre (SEQ ID NO 1) o 500 pb de TNNT2 modificado (SEQ ID NO 2) en cardiomiocitos derivados de iPSC *MYBPC3*^{-/-} transducidos. Por el contrario, los cardiomiocitos derivados de iPSC *MYBPC3*^{-/-} transfectados con un plásmido (en lugar de transducido con virus) que codifican MYBPC3 bajo el control de 600 pb de TNNT2 de tipo silvestre (SEQ ID NO 1) o 400 pb de promotor de TNNT2 modificado (SEQ ID NO 3) mostraron una expresión de proteína MYBPC3 similar.

10

15

Ejemplo 3: Modelo de miocardiopatía hipertrófica grave en ratones *Mybpc3*^{-/-}

Los ratones con inactivación (KO) de *Mybpc3* homocigotos se generaron sobre un fondo C57Bl/6 mediante una delección de ARNg emparejada CRISPR-Cas9 de los exones uno y dos (**Figura 4A**). Los ratones KO mostraron déficits graves en la función cardíaca (**Figura 4C y la Figura 4D**) y la hipertrofia cardíaca pronunciada (**Figuras 4E-4G**) a las dos semanas de edad, a pesar de las relaciones mendelianas normales y el peso corporal comparable a los compañeros de camada de tipo silvestre (**Figura 4B**). Este modelo tiene hipertrofia cardíaca más grave que otros modelos (Schlossarek et al. *Basic Res. Cardiol.* 107:1-13 (2012)). Nuestros ratones KO muestran HCM grave de aparición temprana en jóvenes (ratones de dos semanas de vida) que modelan la aparición pediátrica de HCM en seres humanos, así como HCM en etapa tardía en adultos. Véase

20

25

Lekanne Deprez et al., *J Med Genet* 43:829-832 (2006); Xin et al., *Am J Med Genet Parte A* 143A:2662-2667 (2007); Zahka et al., *Heart* 94:1326-1330 (2008); Marziliano et al., *Neonatology* 102:254-258 (2012); Wessels et al., *Eur J Hum Genet* 23:922-928 (2015).

Ejemplo 4: Expresión del transgén MYBPC3 en tejido cardíaco *in vivo*

5 El propósito de este estudio fue examinar la expresión de proteínas terapéuticas *in vivo* mediante el uso de un sistema de vector basado en AAV que comprende un promotor específico cardíaco modificado.

Los ratones adultos se inyectaron de retroorbitalmente con virus recombinante de AAV9 que comprende el promotor de 600 pb de TNNT2 de tipo silvestre (SEQ ID NO 1) o 400 pb de TNNT2
10 modificado (SEQ ID NO 3) enlazado operativamente a un polinucleótido que codifica *MYBPC3*. Se extrajeron muestras de tejido del corazón, músculo esquelético (tibialis anterior), hígado y todo el cerebro 2 semanas después de la infección. El ARN se extrajo de todos los tejidos, se sintetizó en ADNc y se analizó mediante qRT-PCR mediante el uso de cebadores específicos para *MYBPC3* humano.

15 Como se muestra en la **Figura 5**, los ratones inyectados con el vector basado en AAV9 que comprende el promotor de TNNT2 de tipo silvestre o modificado mostraron altos niveles de ARNm de *MYBPC3* en el tejido cardíaco en comparación con el tejido esquelético, cerebral o hepático. El promotor de 400 pb de la TNNT2 modificada mostró un aumento de la expresión del ARNm de *MYBPC3* en el tejido cardíaco en comparación con el promotor de 600 pb de la TNNT2 de tipo
20 silvestre.

Como se muestra en las Figuras 6A-6B, los ratones adultos recibieron dosis intravenosas mediante inyección en la vena de la cola con un vector de AAV9 con el casete promotor de TNNT2 modificado de 400 pb. Las muestras de tejido del corazón y del hígado se extrajeron 4 semanas después de la inyección. La cuantificación absoluta de genomas virales por microgramo de ADN
25 genómico se evaluó mediante qPCR utilizando estándares linealizados. El ARN se extrajo de todos los tejidos, se sintetizó en ADNc y se analizó mediante qRT-PCR mediante el uso de

cebadores específicos para *MYBPC3* humano. Sorprendentemente, el promotor de 400 pb de TNNT2 retiene una alta selectividad para el corazón: a pesar de los genomas de vector 100 veces mayores detectados en el hígado que el corazón 4 semanas después de la inyección en los animales adultos que recibieron la dosis (**Figura 6A**, escala logarítmica), la expresión hepática del transgén fue menor que 1/10,000 de expresión cardíaca (**Figura 6B**, escala logarítmica).

En conjunto, estos resultados indican que una delección de 200 pb del promotor de TNNT2 de tipo silvestre, *es decir*, el promotor de TNNT2 modificado de 400 pb (SEQ ID NO 3), impulsa eficazmente la expresión de la proteína MYBPC3 en cardiomiocitos con alta selectividad a pesar de la delección de una porción sustancial de la secuencia del promotor.

Ejemplo 5: Rescate de la función cardíaca en ratones *Mybpc3* nulo

Este ejemplo demuestra el rescate funcional de la pérdida de función en el *Mybpc3* en ratones, mediante el uso del vector diseñado para cargas grandes descritas en el Ejemplo 1 y el promotor de hTNNT2 modificado de 400 pb descrito en los Ejemplos 2 y 3.

El promotor hTNNT2 de 400 pb y el gen *Mybpc3* murino se clonaron en el vector mostrado en la **Figura 1C**. Este vector se empaquetó mediante el uso de una cápside de AAV9 para generar el vector de prueba.

En un primer experimento, ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos se inyectaron retroorbitalmente a las dos semanas de vida con un vector de prueba de 1E14 vg·kg⁻¹ que codifica *Mybpc3* o vehículo, HBSS. El tejido cardíaco se extrajo dos semanas después (a las cuatro semanas), junto con el de los compañeros de camada de tipo silvestre. El vector experimental alcanzó niveles de tipo silvestre de expresión de la proteína MYBPC3 en ratones *Mybpc3*^{-/-} dos semanas después de la inyección (**Figura 7**). Concluimos que el vector de prueba fue capaz de expresar MYBPC3 a niveles fisiológicos en animales jóvenes a una dosis tan baja como 1E14 vg·kg⁻¹

En un segundo experimento, el primer experimento se repitió a una dosis más baja, 3E13 vg·kg⁻¹

¹. Los ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos se inyectaron retroorbitalmente a las dos semanas de vida con un vector de prueba de 3E13 vg·kg⁻¹ y 1E14 vg·kg⁻¹ que codifica *Mybpc3* o vehículo, HBSS.

Se detectaron niveles de tipo silvestre de expresión de la proteína MYBPC3 cardíaca mediante ELISA en ratones *Mybpc3*^{-/-} dos y seis semanas después de la inyección (**Figura 8**) Concluimos que el vector de prueba fue capaz de expresar MYBPC3 a niveles fisiológicos en animales jóvenes a una dosis tan baja como 3E13 vg·kg⁻¹

- 5 En un tercer experimento, se evaluó la función cardíaca mediante ensayos relevantes para la miocardiopatía hipertrófica. La miocardiopatía hipertrófica se presenta fisiológicamente como (1) un aumento en el tamaño del corazón, según lo informado como la relación de la masa ventricular izquierda/masa corporal total (LVM/BW) en mg·g⁻¹; y (2) como acortamiento fraccional (FAS), medido mediante ecocardiografía.
- 10 Los ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos se inyectaron retroorbitalmente a las dos semanas de vida con un vector de prueba de 1E13 vg·kg⁻¹, 3E13 vg·kg⁻¹ y 1E14 vg·kg⁻¹ que codifica *Mybpc3* o vehículo, HBSS. Se observó un rescate de la función cardíaca dependiente de la dosis con todas las dosis evaluadas (1E13 vg·kg⁻¹, 3E13 vg·kg⁻¹ y 1E14 vg·kg⁻¹). La LVM/BM disminuyó con respecto al control con vehículo en todas las dosis evaluadas seis semanas después de la
- 15 inyección (**Figura 9A**). FAS (expresado como cambio porcentual % en las dimensiones internas del LV entre la sístole y la diástole, **Figura 9B**) y la fracción de eyección (**Figura 9C**) aumentaron con respecto al control con vehículo en todas las dosis evaluadas seis semanas después de la inyección. Mejoras aún mayores en LVM/BM (**Figura 9D**), FAS (**La Figura 9E**), y EF (**Figura 9F**) se observaron 31 semanas después de la inyección. De manera congruente con niveles iguales
- 20 de expresión de la proteína MYBPC3 observada a dosis de 3E13 vg·kg⁻¹ y 1E14 vg·kg⁻¹ (ver **Figura 8**), los animales tratados con 3E13 vg·kg⁻¹ o 1E14 vg·kg⁻¹ muestran mejoras similares en la hipertrofia, FAS o EF. Incluso con sola dosis 1E13 vg·kg⁻¹, la hipertrofia, el FAS y la EF mejoraron en comparación con el control con vehículo.
- 25 Concluimos que el vector de prueba fue capaz de rescatar la función cardíaca en animales jóvenes a una dosis tan baja como 1E13 vg·kg⁻¹.

El rescate de la función en ratones jóvenes sintomáticos es, en el caso de la miocardiopatía hipertrófica, más difícil que la prevención del deterioro de la función en lactantes, porque la miocardiopatía hipertrófica es un trastorno progresivo. Los animales mayores muestran una enfermedad más grave que los animales más jóvenes. Según nuestro conocimiento, nunca antes se ha demostrado con AAV el rescate de la pérdida de la función de MYBPC3 en animales jóvenes sintomáticos. Nuestro modelo también es una pérdida completa de la función causada por la delección del gen *Mybpc3*, no una pérdida parcial de la función debido a la mutación.

Comparamos nuestros resultados con los informados en Mearini et al., *Nat. Commun.* 5:5515 (2014), que usó un casete de expresión de 5.4 kb que codifica *Mybpc3* en ratones que tienen un polimorfismo de nucleótido único en el gen endógeno *Mybpc3*. Mearni et al. informa la prevención de LVM/BW altos a las dos semanas de vida en ratones inyectados como neonatos (no como jóvenes sintomáticos) con dosis muy altas (1E12 vg y 3E12 vg, que corresponde a 7E14 vg·kg⁻¹ y 2E15 vg·kg⁻¹, en función de una masa neonatal promedio de 1.5 g) de un vector de AAV9 que codifica el mismo gen *Mybpc3*. Mearni et al. usó un promotor de hTNNT2 de 550 pb, en lugar del presente promotor de hTNNT2 modificado de 400 pb. El vector Mearini et al. no evita significativamente el deterioro del FAS, incluso a 2E15 vg·kg⁻¹. Por el contrario, el presente vector demuestra una mejora en los parámetros fisiológicos en animales jóvenes (no solo neonatos) a dosis al menos tan bajas como 1E13 vg·kg⁻¹ a 1E14 vg·kg⁻¹.

Las modificaciones del vector y del promotor aumentan drástica y sorprendentemente la potencia del vector.

Ejemplo 6: Comparación directa entre el casete de 5.4 kpb y el casete de 4.7 kpb

Este ejemplo compara directamente un casete de 5.4 kpb que codifica el gen *Mybpc3* con un casete de 4.7 kpb que codifica el gen *Mybpc3* en ratones homocigotos maduros (2.5 meses de edad) con enfermedad avanzada.

Los ratones *Mybpc3*^{-/-} homocigotos se inyectaron retroorbitalmente con 3E13 vg·kg⁻¹ o 1E14 vg·kg⁻¹ del vector AAV9 que codifica *Mybpc3* en el contexto de los casetes de 5.4 kpb o 4.7 kpb

(Figura 10A), o se inyectaron con el control de vehículo, HBSS. Incluso cuando se dosificó en esta etapa avanzada del deterioro cardíaco, el casete de 4.7 kpb mejoró significativamente la función cardíaca en función de la fracción de eyección (EF) (Figura 10B), con una restauración clara de la función por encima del valor de referencia previo a la dosis (Figura 10C), a diferencia de los animales tratados con el vehículo (Veh) o el casete de 5.4 kpb. Además, en comparación con el casete de 5.4 kpb, el casete de 4.7 kpb también fue capaz de disminuir significativamente la hipertrofia, según lo indicado por LVM/BM, dieciocho semanas después de la inyección (Figura 10D).

Este ejemplo demuestra el rescate funcional de la pérdida de función en el *Mybpc3* en ratones, mediante el uso de la cadena principal del vector y modificaciones de promotores descritas en los Ejemplos 1-3.

Este ejemplo también demuestra que, en un modelo desafiante de la enfermedad, ratones *Mybpc3*^{-/-} adultos homocigotos, un vector de 5.4 kpb (SEQ ID NO 201) a dosis baja no genera ninguna mejora fisiológica; mientras que un vector de 4.7 kpb de acuerdo con la presente descripción provoca una mejora estadísticamente significativa en los parámetros fisiológicos relacionados con la miocardiopatía a dosis tan bajas como 3E13 vg·kg⁻¹.

Ejemplo 7: Mayor eficacia con una mejora de la cápside del AAV que codifica MYBPC3

Este ejemplo demuestra cómo la potencia mejorada del vector de carga grande (Ejemplo 1) y del promotor modificado (Ejemplos 2 y 3) en función del rescate de ratones *Mybpc3*^{-/-} (Ejemplo 5) puede mejorarse aún más mediante el uso de una cápside de AAV modificada genéticamente.

Una variante de la cápside de AAV9, CR9-10, mostró una transducción cardíaca significativamente mayor tras el suministro sistémico en ratones adultos que el AAV9 con un casete codificante de GFP según lo determinado por ELISA ($p < 0.05$, ANOVA unidireccional; prueba de comparación múltiple de Dunnett) (Figura 11A).

En un segundo experimento, el casete de expresión que codifica el gen murino de *Mybpc3* se empaquetó en AAV9 o CR9-10 y se comparó la potencia del rescate cardíaco en ratones *Mybpc3*^{-/-}

Los ratones homocigotos *Mybpc3*^{-/-} se inyectaron retroorbitalmente a las dos semanas de vida con 1E13 vg·kg⁻¹ y 3E13 vg·kg⁻¹ del vector AAV9, el vector CR9-10 o el HBSS de control con vehículo. Todos los artículos de prueba mejoraron significativamente la función cardíaca en función de la fracción de eyección (EF) (**Figura 11B**), con una restauración clara de la función por encima del valor de referencia previo a la dosis (Δ EF) (**Figura 11C**). De manera congruente con la mejora de la transducción cardíaca, CR9-10 produjo una mayor mejora de la EF que el AAV9.

Ejemplo 8: Estudio en primates no humanos de variantes de cápside de AAV modificadas genéticamente

La biodistribución de vectores de AAV que tienen cápsides modificadas genéticamente (descritos en la solicitud de patente provisional de los EE. UU. núm. 63/012,703, que se incorpora en la presente descripción en su totalidad), se evaluaron en macacos de cynomolgus (*Macaca fascicularis*) después del suministro intravenoso.

El vector de AAV generado con catorce cápsides diferentes, incluido el AAV9, se agruparon e inyectaron en NHP a una dosis de 1E13 vg·kg⁻¹ (n=3). El ADN vírico se extrajo del ventrículo izquierdo y el hígado un mes después del suministro sistémico. De acuerdo con los resultados murinos, CR9-10 mostró un aumento de la transducción cardíaca en comparación con AAV9 (**Figura 12A**). Además, muchas variantes disminuyeron la carga viral hepática con relación a AAV9 (**Figura 12B**), lo que mejora la relación de la transducción del ventrículo izquierdo con respecto a la infección hepática (**Figura 12C**).

Ejemplo 10: Rescate de la función cardíaca con el gen humano MYBPC3 en ratones *Mybpc3* nulo

Este ejemplo demuestra la capacidad del gen *MYBPC3* humano para rescatar ratones *Mybpc3*^{-/-}.

Los ratones homocigotos *Mybpc3*^{-/-} se inyectaron retroorbitalmente a las dos semanas de vida con AAV9 que codifica el gen *Mybpc3* de ratón (m*Mybpc3*) (a 1E14 vg·kg⁻¹), AAV9 que codifica

el gen *MYBPC3* humano (hMYBPC3) (a $1\text{E}14\text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$), o vehículo, HBSS. El tamaño y la actividad cardíaca se monitorearon mediante ecocardiografía hasta ocho meses después de la inyección. Los resultados indican que el reemplazo de MYBPC3 cardíaco mediado por AAV9 de mMybpc3 y hMYBPC3 en ratones *Mybpc3*^{-/-} dio como resultado la recuperación del tamaño y la función cardíacas. La fracción de eyección (EF) mejoró significativamente tanto por los ortólogos humanos como de ratón de MYBPC3, con mMybpc3 que produjo una mayor mejora en la EF en comparación con hMYBPC3 (**Figura 13A**). Cabe destacar que hMYBPC3 fue tan potente como mMybpc3 para reducir la hipertrofia cardíaca con el tiempo, como lo evidencia la masa ventricular izquierda normalizada al peso corporal (LVM/BW) (**Figura 13B**). Esto se validó además mediante disminuciones comparables en el grosor de la pared posterior ventricular izquierda durante la diástole (LVPW;d) (**Figura 13C**). Críticamente, todas las mejoras mostraron una estabilidad sólida hasta 8 meses después de la inyección.

En un segundo estudio, se evaluó la eficacia de hMYBPC3 en un rango de dosis víricas. Los ratones homocigotos *Mybpc3*^{-/-} se inyectaron retroorbitalmente a las dos semanas de vida con $1\text{E}13\text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $1\text{E}14\text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $3\text{E}14\text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$ del vector de prueba que codifica el gen o vehículo humano *MYBPC3*, HBSS. Se observó una mejora dependiente de la dosis de la función cardíaca con todas las dosis evaluadas ($1\text{E}13\text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$, $1\text{E}14\text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $3\text{E}14\text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$) catorce semanas después de la inyección, según lo indicado por la EF (**Figura 14A**), con una mejora significativa por encima del valor inicial antes de la dosis para los tratamientos con $1\text{E}14\text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $3\text{E}14\text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (**Figura 14B**). También se observó una reducción significativa en la hipertrofia cardíaca para los tratamientos con $1\text{E}14\text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $3\text{E}14\text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$, en función de la LVM/BW (**Figura 14C**). Por lo tanto, concluimos que el vector de prueba hMYBPC3 fue capaz de preservar la función cardíaca en animales adultos a una dosis tan baja como $1\text{E}13\text{ vg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Ejemplo 11: Tratamiento de la miocardiopatía hipertrófica (HCM)

La miocardiopatía es la principal causa de paro cardíaco súbito en niños menores de 18 años. La miocardiopatía hipertrófica (HCM) afecta a 0.5 millones de estadounidenses, lo que puede

provocar insuficiencia cardíaca o muerte súbita. Las mutaciones de pérdida de función en la *proteína de unión a la miosina C3*, *MYBPC3*, son la causa genética más frecuente de la HCM. La mayoría de las mutaciones de *MYBPC3* que provocan la HCM provocan truncamientos, a través de mutaciones sin sentido, de desplazamiento del marco de lectura o en el sitio de empalme. La fisiopatología sarcómera de la mayoría de los pacientes con HCM con mutaciones de *MYBPC3* parece deberse a la haploinsuficiencia, ya que la cantidad total de proteína MYBPC3 incorporada en los sarcómeros cae significativamente por debajo de lo normal. La disminución de los niveles de sarcómero de MYBPC3 provoca una disminución de la inhibición de la miosina con más cabezas de miosina acopladas en el filamento de actina, lo que provoca hipercontractilidad.

El camino más claro hacia el tratamiento de la haploinsuficiencia es la restauración del producto génico insuficiente; en este caso, MYBPC3 de tipo silvestre. Por lo tanto, hemos diseñado con éxito un vector de AAV (TN-201) con propiedades superiores para la restauración selectiva de MYBPC3 a cardiomiocitos tras el suministro sistémico. Fundamentalmente, hemos demostrado por primera vez con AAV la capacidad tanto de un sustituto de ratón como de TN-201 de revertir la disfunción cardíaca y la hipertrofia en un modelo murino sintomático de la enfermedad.

Los estudios de eficacia de determinación de la dosis mostraron la restauración de los niveles de proteína MYBPC3 de tipo silvestre y la saturación de la mejora cardíaca con la dosis clínicamente relevante de 3E13 vg/kg. Además, los estudios piloto de seguridad en ratones adultos y lactantes a los que se les inyectó >10 veces una dosis eficaz no mostraron observaciones clínicas, alteraciones en la función cardíaca ni hallazgos histopatológicos. Cabe destacar que hemos determinado que el TN-201 producido utilizando la plataforma Sf9 altamente escalable da como resultado una eficacia similarmente potente en un modelo de enfermedad *Mybpc3^{-/-}*. Finalmente, hemos establecido que nuestra eficacia observada es suficientemente significativa para un beneficio estable hasta 8 meses después de la inyección, así como para la reversión de la disfunción cardíaca incluso en la enfermedad de homocigotos en etapa tardía.

Ejemplo 12: Estudios clínicos

Una composición farmacéutica que comprende viriones de rAAV que codifican MYBPC3, como se describe en la presente descripción, se administra por vía intravenosa o mediante seno coronario retrógrado (RCSI). La eficacia funcional se determina mediante evaluaciones del estado funcional cardíaco (*p. ej.*, Clasificación funcional de la Asociación Cardiológica de Nueva York, NYHA; Prueba de ejercicio cardiopulmonar, CPET), cuestionarios sobre la calidad de vida (*p. ej.*, Puntaje de calidad clínica del cuestionario de miocardiopatía de la ciudad de Kansas, KCCQ-CSS), imágenes cardíacas (*p. ej.*, ecocardiografía), biomarcadores cardíacos (*p. ej.*, troponina y NT-proBNP), ritmo cardíaco y evaluaciones inmunitarias, evaluaciones del estado funcional cardíaco (*p. ej.*, Registro interinstitucional pediátrico de apoyo circulatorio asistido mecánicamente, PEDIMACS; clasificaciones Ross), y/o eventos adversos cardíacos importantes (MACE) (muerte total, trasplante cardíaco, inicio de los inotrópicos, iniciación de la ventilación o soporte circulatorio mecánico). Los estudios clínicos pueden incluir el monitoreo de la seguridad y la eficacia continua (*p. ej.*, eventos adversos, eventos adversos graves, electrocardiograma, enzimas cardíacas, biomarcadores, estado funcional, función/masa ventricular izquierda (LV), calidad de vida, bioquímica sérica, pruebas de la función hepática) anualmente durante un máximo de 10 años.