

TERAPIA GÉNICA PARA DEFICIENCIAS RELACIONADAS CON LÁMINA A

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS ELECTRÓNICO

[0001] El listado de secuencias electrónico presentado con la presente con el nombre «UPN-22-9866PCT.xml» con un tamaño de 62,136 bytes, creado el día 22 de diciembre de 2022, y los contenidos del listado de secuencias electrónico (por ejemplo, las secuencias y texto en este) se incorporan a la presente en su totalidad.

ANTECEDENTE DE LA INVENCION

[0002] Se estima una prevalencia de la cardiopatía dilatada idiopática (DCM, por sus siglas en inglés) de 1:500 (Hershberger, R., Hedges, D. y Morales, A. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. Nat Rev Cardiol 10, 531-547 (2013)). Se estimó que alrededor del 40 % de la causa genética de la DCM se origina de variantes raras de menos de 3 genes que, a su vez, afectan las funciones de diversas proteínas, genes entre los cuales se encuentra el gen Lámina A (LMNA). La prevalencia estimada de mutaciones en el gen Lámina A (LMNA) en la DCM idiopática se estima en el 5,9 % (19/324) de probandos de DCM no relacionados (Estados Unidos) (Parks SB, Kushner JD, Nauman D, et al. Lamin A/C mutation analysis in a cohort of 324 unrelated patients with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy. Am Heart J 2008; 156:161-9), y el 6 % (35/561) de pacientes con DCM (Noruega) (Hasselberg et al. European Heart Journal (2018) 39, 853-860). Las mutaciones de pérdida de función más comunes causan una forma de origen adulto de cardiopatía dilatada con defectos de conducción. La prevalencia estimada general de la cardiopatía relacionada con LMNA es una población de 1:8000 (40 000 pacientes en EUA). Los pacientes típicamente presentan en la 4.^a o 5.^a década arritmias atriales o defectos de conducción atrioventriculares (AV), antes de evolucionar a un bloqueo AV total, cardiopatía dilatada, arritmias ventriculares y falla cardíaca en etapa final. A la edad de 60, se le colocó a la mayoría de los pacientes un desfibrilador cardioversor implantable, recibió un trasplante de corazón o falleció.

[0003] Las proteínas Lámina A y C son componentes estructurales esenciales de la envoltura nuclear, y también desempeñan un rol en la expresión génica a través de interacciones con cromatina. Las mutaciones en el gen Lámina A/C (LMNA) también se relacionaron con diversos fenotipos clínicos diferentes a DCM, inclusive neuropatía, distrofia muscular, progeria y lipodistrofia (Kang et al. BMB Reports 2018;51:327-37).

[0004] No existe tratamiento estándar o cura para la DCM idiopática y los trastornos relacionados con LMNA. Existe una necesidad insatisfecha en la técnica de composiciones y métodos para el tratamiento eficaz de la DCM idiopática y los trastornos relacionados con LMNA.

COMPENDIO DE LA INVENCION

[0005] En un aspecto, se proporciona en la presente un virus adenoasociado recombinante que comprende una cápside y que tiene empaquetado en su interior un genoma de vector, donde el genoma de vector comprende una repetición terminal invertida (ITR) 5' de AAV, un casete de expresión y una ITR 3' de AAV, donde el casete de expresión comprende un marco de lectura abierto (ORF) modificado para una secuencia codificante de Lámina A humana (hLáminaA) madura que codifica la hLáminaA madura que no tiene la cola de extremo carboxi (C) de la preproteína, donde el ORF se une operativamente a las secuencias de control reguladoras que dirigen la expresión directa de la proteína hLáminaA madura en una célula, y donde las secuencias de control reguladoras comprenden un promotor, opcionalmente un potenciador y una secuencia de poliadenilación (poliA). En determinadas modalidades, el ORF tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de ácido nucleico al menos un 90 % idéntica con respecto a la SEQ ID NO: 4 que codifica hLámina A madura que no tiene la cola de extremo carboxi (C) de la preproteína. En determinadas modalidades, el ORF se une operativamente a las secuencias de control reguladoras que comprenden un promotor que es un promotor cardíaco. En determinadas modalidades, el promotor es un promotor de troponina T cardíaca de pollo. En determinada modalidad, la secuencia de control reguladora comprende adicionalmente un potenciador IE CMV, una secuencia de poliadenilación de globina

de conejo y/u opcionalmente un elemento WPRE.

[0006] En determinadas modalidades, el casete de expresión tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia de ácido nucleico al menos un 90 % idéntica con respecto a la SEQ ID NO: 2. En determinadas modalidades, el genoma del vector tiene la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 (CMV-IE.chTNTp.LáminaA.RBG). En determinadas modalidades, la cápside es una cápside de AAVhu68, una cápside de AAVhu95 o cápside de AAVhu96.

[0007] En un aspecto adicional, se proporciona en la presente una composición y una composición farmacéutica que comprende un rAAV o un vector como se describe en la presente y un medio de suspensión acuoso. En determinadas modalidades, el rAAV o la composición de este es para usar en el tratamiento de una cardiopatía dilatada idiopática (DCM) o una enfermedad relacionada con una mutación en un gen Lámina A (LMNA). En determinadas modalidades, la enfermedad relacionada con una mutación en un gen LMNA se selecciona de distrofia muscular, neuropatía, lipodistrofia, progeroide segmental.

[0008] En otro aspecto, se proporciona en la presente un método para tratar, aliviar o mejorar uno o más síntomas de una cardiomiopatía dilatada idiopática (DCM) en un sujeto que lo necesita. En un aspecto adicional, se proporciona en la presente un método para tratar, aliviar o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad relacionada con una mutación en un gen Lámina A (LMNA) en un sujeto. En determinadas modalidades, la DMC idiopática es una DCM idiopática de inicio precoz. En determinadas modalidades, la DCM idiopática es una forma de inicio adulto de DCM idiopática con defectos de conducción. En determinadas modalidades, la enfermedad relacionada con una mutación de pérdida de funciones en un gen LMNA se selecciona de distrofia muscular, neuropatía, lipodistrofia, progeroide segmental, seleccionada opcionalmente de forma adicional de distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), síndrome de Malouf (MLF), distrofia muscular congénita (MDC), distrofia muscular de Lomp-Gardle tipo IB (LGMD1B), enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, tipo 2B1 (CMT2B1), neuropatía axonal, lipodistrofia parcial familiar tipo 2

(FPLD2), lipodistrofia con displasia mandibuloacral (MAD), displasia mandibuloacral tipo A (MADA), síndrome de Wemer atípico (AWS), síndrome de envejecimiento prematuro (progeria) y síndrome de progeria de Hutchinson-Glifford (HGPS). En determinadas modalidades, los síntomas de la enfermedad comprenden bloqueo de la conducción atrioventricular (AV), fibrilación atrial, arritmia atrial, inclusive aleteo atrial y taquicardia atrial, arritmias ventriculares inclusive taquicardias ventriculares sostenidas y fibrilación ventricular (VF). En determinadas modalidades, el método comprende adicionalmente el tratamiento conjunto con beta bloqueadores, inhibidores de la enzima conversiva de angiotensina (ACE), diuréticos, desfibriladores cardioversores implantables (ICD), marcapasos (PM) y/o terapia resincronización cardíaca (CRT).

[0009] En otro aspecto, se proporciona en la presente una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende un casete de expresión de la SEQ ID NO: 2. En determinadas modalidades, la molécula de ácido nucleico es un plásmido. En determinadas modalidades, se proporciona una célula empaquetadora que comprende un casete de expresión, un genoma de vector o plásmido.

[0010] Estos y otros aspectos de la invención son evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0011] La FIG. 1A muestra los niveles relativos de transferencia génica a un corazón de NHP graficados como cambios de múltiplo en las lecturas de la secuenciación de ARN (prevalencia de lecturas de ARN en el tejido con respecto a la concentración del vector administrada) con respecto a AAVhu68.

[0012] La FIG. 1B muestra los niveles de transducción en un corazón de ratón luego de la administración con AAVhu68 o AAVhu95 que comprende el gen que codifica la proteína fluorescente verde, graficados como el porcentaje de área positiva para GFP.

[0013] La FIG. 1C muestra los niveles de transducción en un corazón de ratón luego

de la administración con AAVhu68 o AAVhu95 que comprende el gen que codifica la proteína fluorescente verde, graficados como la cantidad de copias/ng de ARN.

[0014] La FIG. 2A muestra una gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones con inactivación (KO) de Lámina y de tipo salvaje (WT) a los que se les administró en la etapa de recién nacidos un control de vehículo o AAVhu68.hLáminaA de forma intravenosa en una dosis de 5×10^{10} GC (aproximadamente 3×10^{13} GC/kg).

[0015] La FIG. 2A muestra los pesos corporales de ratones con inactivación (KO) de Lámina y de tipo salvaje (WT) a los que se les administró en la etapa de recién nacidos un control de vehículo o AAVhu68.hLáminaA de forma intravenosa en una dosis de 5×10^{10} GC (aproximadamente 3×10^{13} GC/kg).

[0016] La FIG. 2C muestra una transferencia western representativa que confirma la expresión de LáminaA en el corazón y una falta de expresión de LáminaA en el hígado luego de la administración de AAVhu68.hLáminaA en ratones inactivados.

[0017] La FIG. 3A muestra una imagen microscópica representativa del análisis inmunohistoquímico (IHC) de la tinción con lámina antihumana de tejido hepático de ratón FRG, luego del trasplante de hepatocitos humanos (células humanas son aquellas que muestran la tinción de lámina).

[0018] La FIG. 3B muestra una imagen microscópica representativa del análisis inmunohistoquímico (IHC) con lámina antihumana del tejido cardíaco de ratón, luego de la administración en la etapa de recién nacido de un control de vehículo.

[0019] La FIG. 3C muestra una imagen microscópica representativa del análisis inmunohistoquímico (IHC) con lámina antihumana del tejido cardíaco de ratón, luego de la administración en la etapa de recién nacido con AAVhu68.hLáminaA de forma intravenosa a una dosis de 5×10^{10} GC (aproximadamente 3×10^{13} GC/kg).

[0020] La FIG. 4A muestra un análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR en el tiempo, en ratones KO Lámina A a los que se les

administró AAV (0-23).

[0021] La FIG. 4B muestra un análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR en el tiempo, en ratones KO Lámina A a los que se les administró AAV (24-48).

[0022] La FIG. 4C muestra un análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR durante el tiempo en ratones WT a los que se les administra un vehículo (PBS) (0-12).

[0023] La FIG. 4D muestra un análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR durante el tiempo en ratones WT a los que se les administra un vehículo (PBS) (13-26).

[0024] La FIG. 5A muestra un análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR en el tiempo en ratones KO Lámina A a los que se les administró un vehículo (PBS) (0-18).

[0025] La FIG. 5B muestra un análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR en el tiempo en ratones KO Lámina A a los que se les administró un vehículo (PBS) (19-38).

[0026] La FIG. 5C muestra un análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR en el tiempo en ratones KO Lámina A a los que se les administró un vehículo (PBS) (ampliación en 5A, tiempo 0-10).

[0027] La FIG. 5D muestra un análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR en el tiempo en ratones KO Lámina A a los que se les administró un vehículo (PBS) (ampliación en 5B, tiempo 7,00-7,45).

[0028] La FIG. 6A muestra los resultados del ecocardiograma en ratones con inactivación (KO) y de tipo salvaje (WT) a los que se les administró un vehículo (PBS) o AAV, graficados como la fracción de eyección (%) (Kruskal-Wallis no paramétrico con Anova de una vía con una prueba de comparación múltiple de Dunn: $P < 0,05$,

P<0,01, *P<0,01, ****p<0,0001).

[0029] La FIG. 6B muestra los resultados del ecocardiograma en ratones con inactivación (KO) y de tipo salvaje (WT) a los que se les administró un vehículo (PBS) o AAV, grafados como un acortamiento fraccional (%) (Kruskal-Wallis no paramétrico con Anova de una vía con una prueba de comparación múltiple de Dunn P<0,05, **P<0,01, ***P<0,01, ****p<0,0001).

[0030] La FIG. 6C muestra los resultados del ecocardiograma en ratones con inactivación (KO) y de tipo salvaje (WT) a los que se les administró un vehículo (PBS) o AAV, grafados como el volumen sistólico (μ L) (Kruskal-Wallis no paramétrico con Anova de una vía con una prueba de comparación múltiple de Dunn: P<0,05, **P<0,01, ***P<0,01, ****p<0,0001).

[0031] La FIG. 7A muestra una imagen representativa del análisis de histología del tejido cardíaco en ratones inactivados luego de la administración de PBS en ratones con inactivación.

[0032] La FIG. 7B muestra una imagen representativa de análisis histología del tejido cardíaco en ratones inactivados luego de la administración de AAV-LMNA en ratones inactivados, lo que confirma la expresión de Lámina A en células cardíacas ventriculares.

[0033] La FIG. 8 muestra un análisis de transferencia western representativa para determinar la expresión de Lámina A en ratones a los que se les administró AAVhu95-LMNA.

[0034] La FIG. 9A muestra los resultados del estudio de telemetría de LMNA grafados como el porcentaje de WT-PBS de la expresión de LMNA en ratones de tipo salvaje y con inactivación heterocigota luego de la administración con PBS (control) o AAV-LMNA.

[0035] La FIG. 9B muestra los resultados del estudio de telemetría de LMNA grafados

como el porcentaje de WT-PBS de la expresión de LMNC en ratones de tipo salvaje y con inactivación heterocigota luego de la administración con PBS (control) o AAV-LMNA.

[0036] La FIG. 9C muestra un análisis de transferencia western representativo de muestras cardíacas para la expresión de Lámina A y Lámina C en ratones (ratones de tipo salvaje y con inactivación heterocigota) a los que se les administró AAVhu95-LMNA.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0037] Se proporcionan en la presente secuencias, casetes de expresión y un vector que expresan la proteína de Lámina A madura funcional humana (hLÁmina A) y las composiciones que las contienen. También se proporcionan en la presente métodos útiles para el tratamiento de la cardiopatía LMNA (por ejemplo, cardiomiopatía dilatada idiopática (DCM) o una enfermedad relacionada con una mutación en un gen de Lámina A (LMNA)) y/o la mejora de síntomas de esta. En determinadas modalidades, la proteína Lámina A humana (hLÁmina A) se administra mediante el AAV como se proporciona en la presente.

[0038] Las diversas secuencias de ácido nucleico proporcionadas en la presente son útiles para empaquetar la secuencia codificante de hLámina A madura funcional en el vector adecuado (por ejemplo, rAAV) o un elemento genético útil para la fabricación (por ejemplo, plásmido).

[0039] El gen Lámina A/C (LMNA) se ubica en el loci del cromosoma 1q21.2 y contiene sitios de corte y empalme alternativos que codifican las proteínas Lámina A o Lámina C (Kang S., et al., 2018). Las secuencias de aminoácidos naturales de LáminaA y LáminaC son idénticas en los primeros 566 aminoácidos, pero LáminaC tiene un extremo C único (C-) de 6 aminoácidos "VSGSRR" (SEQ ID NO: 21)). En contraste, la proteína Lámina A madura tiene en su extremo C: "GSHCSSSGDPAEYNLRSRTVLCGTGQPADKASASGSGAQVGGPISSGSSASSVT

VT RSYRSVGGSGGGSGFDNLVTRSY" (SEQ ID NO: 22).

[0040] La SEQ ID NO: 19 proporciona la preproteína Lámina A de longitud completa, es decir, 664 aminoácidos, que es la Lámina A madura con el extremo carboxi anterior y una cola carboxi de 18 aminoácidos que comprenden un motivo Caax (es decir, CSIM) y un motivo farnesilado en un extremo carboxi (C-) de la secuencia de aminoácidos. La pre Lámina A madura mediante la escisión mediada por proteasa de los últimos 18 aminoácidos, lo que tiene como resultado una Lámina A madura. La SEQ ID NO: 5 hace referencia a la proteína Lámina A madura, que no tiene los motivos de la cola de extremo C de la preproteína (LLGNSSPRTQSPQNCSIM; SEQ ID NO: 20).

[0041] Como se utiliza en la presente, la expresión «Lámina A funcional» y/o «Lámina A humana madura funcional» hace referencia a una proteína que tiene una secuencia de la proteína Lámina A madura que tiene la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una secuencia alrededor del 95 % a alrededor del 100 % idéntica a esta, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, el 99,9 % idéntico a esta, y valores entre estos, como se determina a través de las secuencias de aminoácidos contiguas que proporcionan al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o una actividad o función biológica similar y/o igual o mayor al 100 % que una Lámina A humana madura de tipo salvaje. Esta actividad o función biológica puede estar determinada mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, en un ensayo in vitro, modelo animal o mediante el monitoreo de pacientes luego del tratamiento para la corrección de síntomas de una afección relacionada con LáminaA disfuncional o no funcional. En determinadas modalidades, la Lámina A humana madura mutante puede tener una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras en comparación con una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, por ejemplo, 1 a 30 cambios de aminoácidos. En determinadas modalidades, una proteína LáminaA humana madura mutante puede ser alrededor del 95 % a alrededor del 100 % idéntica con respecto a la SEQ ID NO: 5 y

comprende una o más sustituciones, así como también inserciones y/o eliminaciones, de aminoácidos conservadoras, no conservadoras. En determinadas modalidades, las sustituciones que tienen como resultado LáminaA humana mutante que tiene la SEQ ID NO: 21 ("VSGSRR") en la región de los aminoácidos 567 a 572 (como se hace referencia en la SEQ ID NO: 5) se excluyen. En determinadas modalidades, alrededor del 10 % a alrededor del 100 % de Lámina humana madura de tipo salvaje. En determinadas modalidades, se logra al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % de actividad y/o función de Lámina A humana madura de tipo salvaje. En determinadas modalidades, se logra más del 100 %, por ejemplo, alrededor del 105 %, alrededor del 110 %, alrededor del 115 %, alrededor del 120 %, alrededor del 125 %, alrededor del 130 % o más de actividad y/o función de Lámina A humana madura de tipo salvaje.

[0042] Como se describe en la presente, cualquier variante o mutante de la Lámina A humana madura expresada a partir de secuencias de ácido nucleico como se proporciona en la presente o variaciones de estas, que restaura una función deseada, alivia un síntoma, mejora los síntomas asociados con DCM o una enfermedad asociada con una mutación en el gen LMNA. Las sustituciones de aminoácidos se seleccionan para evitar cualquier cambio que vuelva disfuncional o no funcional a la Lámina A humana madura, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones asociadas con la enfermedad como se describe en la presente.

[0043] Como se utiliza en la presente, el "reemplazo de aminoácidos conservador" o las "sustituciones de aminoácidos conservadores" hace referencia a un cambio, reemplazo o sustitución de un aminoácidos con respecto a un aminoácido diferente con propiedades bioquímicas similares (por ejemplo, carga, hidrofobicidad y tamaño) conocido por los expertos en la técnica. Ver también, por ejemplo, FRENCH et al. What is a conservative substitution? Journal of Molecular Evolution, March 1983, Volumen 19, Número 2, pp 171-175 y YAMPOLSKY et al. The Exchangeability of Amino Acids in Proteins, Genetics. ago 2005; 170(4): 1459-1472, cada uno de los cuales se

incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. Si desear limitarse a ninguna teoría en particular, la sustitución de aminoácidos conservadora excluye las sustituciones de aminoácidos con respecto a la proteína Lámina A madura que es/son asociadas con una enfermedad, como se describe en la presente.

[0044] Los siguientes son ejemplos de sustituciones de aminoácidos que pueden volver disfuncional o no funcional a LáminaA humana madura. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos en Lámina A que se asocian con DCM pueden incluir uno o más de: Q6X, E203K, R25G, R25P, E203G, R25W, L215P, L59R, R225X, R60G, Y267C, E82K, E317K, L85R, A347K, R89L, R349L, K97E, Q355X, S143P, R399C, E161K, R435C, R190W, R541C, D192G, R541S, N195K, S573L, S573L, R133P, E358K, L530P, R584H, T623S, y R644C (como se hace referencia numerando la secuencia de aminoácidos de la preproteína Lámina A; SEQ ID NO: 19). Las sustituciones de aminoácidos en la proteína Lámina A que se asocian con la distrofia muscular pueden incluir uno o más de: Q6X, G232E, G449D, A57P, N39S, R25G, R25P, L248P, R453W, L59R, R50P, Y259X, R25G, R249Q, L454P, R249W, E358K, E33G, R249W, N456I, L302P, R377H, L35V, F260L, N456K, E358K, R377L, N39S, Y267C, D461Y, L380S, R399C, A43T, S268P, W467R, R453P, Y481H, Y45C, L271P, I469T, R455P, R50S, Q294P, W520S, N456D, I63S, S295P, R527P, I63N, S303P, T528K, E65G, R336Q, T528R, R89C, R343Q, L529P, R133P, E358K, L530P, L140P, E361K, R541H, T150P, M371K, R541S, R189P, R377L, R541P, R190Q, R386K, G602S, R196S, R401C, R624H, H222P, V442A, H222Y, D446V (como se hace referencia en la numeración de la secuencia de aminoácidos de la preproteína Lámina A SEQ ID NO: 19). Las sustituciones de aminoácidos en la proteína Lámina A se asocian con neuropatía pueden incluir R298C (como se hace referencia en la numeración de la secuencia de aminoácidos de la preproteína Lámina A; SEQ ID NO: 19). Las sustituciones de aminoácidos en la proteína Lámina A que se asocian con lipodistrofia pueden incluir uno o más de: R25W, V440M, R60G, R471C, R62G, R527C, AK208, R527H, D230N, A529V, G456D, R482W, R482Q, R482L, P485R, K486N, S573L, R582H, R584H (como se hace referencia en la numeración de la secuencia de aminoácidos de la preproteína Lámina A; SEQ ID NO: 19). Las

sustituciones de aminoácidos en la proteína Lámina A que se asocian con progeroide segmental pueden incluir uno o más de: A57P, T10I, R133L, S143E, L140R, S143F, D300N, E145K, Q656Q, R471C, R527C, T528M, M540T, K542N, E578V, V607V, G608S, G608G, T623S (como se hace referencia en la numeración de la secuencia de aminoácidos de la preproteína Lámina A; SEQ ID NO: 19). Ver también, Kang, S., et al., Laminopathies; Mutations on single gene and various human genetic diseases, BMB Reports 2018, 51(7):327-337; Rankin, J., et al., The laminopathies: a clinical review, Clin. Genet., 2006, 70:261-274; Vigouroux C, Bonne G. Laminopathies: One Gene, Two Proteins, Five Diseases. En: Madame Curie Bioscience Database [Internet], Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013, ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6151/, que se incorporan en su totalidad a la presente mediante referencia.

[0045] En una modalidad, la hLámina A madura funcional tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos al menos alrededor del 95 % (por ejemplo, al menos el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,9 %) idéntica a esta.

[0046] En determinadas modalidades, una proteína LáminaA madura funcional mejora síntomas o retrasa la evolución de una cardiopatía de LMNA (por ejemplo, cardiopatía dilatada idiopática (DCM)) o una enfermedad asociada con una mutación en un gen de Lámina (LMNA) en un modelo animal. Un modelo animal ejemplificado es un ratón con inactivación de LMNA (LMNA-ko). Pueden usarse otros modelos adecuados. Los síntomas o evolución de la cardiopatía LMNA pueden evaluarse con el uso de diversos ensayos/métodos, inclusive, de forma no taxativa, una gráfica de supervivencia (por ejemplo, gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier), monitoreo de pesos corporales, ecocardiograma (eco) y electrocardiograma (EKG o ECG). En determinada modalidad, la administración o expresión de una proteína hLámina A madura funcional en un modelo animal conduce al alivio de los síntomas de la cardiopatía de LMNA o el retraso de la evolución de la cardiopatía mostrada en un resultado de un ensayo que es al menos alrededor del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 99,9 %.

100 %, o más del 100 % de lo que se obtiene en un animal de tipo salvaje correspondiente. En determinadas modalidades, la administración o la expresión de una proteína hLámina A madura funcional en un modelo animal de cardiomiopatía LMNA conduce al alivio de los síntomas de cardiomiopatía de LMNA o retrasar la evolución de la cardiomiopatía de LMNA mostrado en un resultado de ensayo mejorado que es al menos alrededor del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 %, o más del 100 % de lo que se obtiene de un animal con cardiomiopatía de LMNA no tratada correspondiente.

Marco de lectura abierto y moléculas de ácido nucleico de LáminaA

[0047] En un aspecto, se proporciona en la presente una secuencia codificante de hLáminaA que es una secuencia codificante de hLámina A modificada. En una modalidad, la secuencia modificada es útil para mejorar la producción, la transcripción, la expresión o seguridad en un sujeto. En otra modalidad, la secuencia modificada es útil para aumentar la eficacia de las composiciones terapéuticas o el tratamiento resultantes. En una modalidad adicional, la secuencia modificada es útil para aumentar la eficacia de la proteína hLáminaA madura funcional que se expresa, pero también permitir una dosis inferior de un reactivo terapéutico que se administra la proteína funcional para aumentar la seguridad.

[0048] En un aspecto, se proporciona en la presente una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia codificante de hLámina A modificada que codifica una LáminaA humana madura funcional (hLámina A). En determinadas modalidades, la secuencia codificante de hLámina A modificada comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de alrededor del 90 %, al menos el 95 % idéntica, al menos el 97 % idéntica, al menos el 98 % idéntica, o el 99 % al 100 % idéntica con respecto a la SEQ ID NO: 4 y que expresa la proteína hLámina A madura funcional.

[0049] En determinadas modalidades, la secuencia codificante hLáminaA modificada es la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de ácido nucleico al menos un 90 % (por ejemplo,

al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o al menos un 99,9 %) idéntica a este que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

[0050] Un «ácido nucleico», tal como se describe en la presente, puede ser ARN, ADN o una modificación de estos, y puede ser de cadena simple o doble, y puede seleccionarse, por ejemplo, de un grupo que incluya: ácido nucleico que codifique una proteína de interés, oligonucleótidos, análogos de ácido nucleico, por ejemplo, ácido péptido-nucleico (APN), APN pseudocomplementario (pc-APN), ácido nucleico bloqueado (LNA), etc. Tales secuencias de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, de forma no taxativa, secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas, por ejemplo, que actúan como represores transcripcionales, moléculas antisentido, ribozimas, pequeñas secuencias de ácido nucleico inhibitoras, por ejemplo, entre otros a ARNi, ARNhc, ARNsi, micro ARNi (ARNm), oligonucleótidos antisentido, etc.

[0051] Las expresiones «porcentaje (%) de identidad», «identidad de secuencia», «porcentaje de identidad de secuencia» o «idéntica en un porcentaje del», en el contexto de secuencias de ácidos nucleicos, hacen referencia a los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para determinar la correspondencia. La longitud de la comparación de identidad de secuencia puede ser la longitud completa del genoma, se desea la longitud completa de una secuencia codificadora de genes o un fragmento de al menos alrededor de 500 a 5000 nucleótidos. Sin embargo, también se puede desear la identidad entre fragmentos más pequeños, por ejemplo, de al menos alrededor de nueve nucleótidos, normalmente al menos alrededor de 20 a 24 nucleótidos, al menos alrededor de 28 a 32 nucleótidos, al menos alrededor de 36 o más nucleótidos.

[0052] Es posible determinar fácilmente el porcentaje de identidad para secuencias de aminoácidos en la longitud completa de una proteína, un polipéptido, alrededor de 32 aminoácidos, alrededor de 330 aminoácidos o un fragmento peptídico de estos o las secuencias codificantes de la secuencia de ácidos nucleicos correspondiente. Un

fragmento de aminoácidos adecuado puede tener al menos alrededor de 8 aminoácidos de longitud y hasta alrededor de 700 aminoácidos. Por lo general, cuando se hace referencia a la «identidad», «homología» o «similitud» entre dos secuencias diferentes, la «identidad», «homología» o «similitud» se determina en referencia a secuencias «alineadas». Las secuencias «alineadas» o «alineaciones» hacen referencia a múltiples secuencias de ácidos nucleicos o secuencias de proteínas (aminoácidos), que a menudo contienen correcciones para bases o aminoácidos faltantes o adicionales en comparación con una secuencia de referencia.

[0053] Las alineaciones se realizan mediante el uso de cualquiera de una variedad de programas de alineaciones de secuencias múltiples disponibles al público o a nivel comercial. Se encuentran disponibles programas de alineación de secuencias para secuencias de aminoácidos, por ejemplo, los programas «Clustal X», «Clustal Omega», «MAP», «PIMA», «MSA», «BLOCKMAKER», «MEME» y «Match-Box». Por lo general, cualquiera de estos programas se usa con la configuración predeterminada, si bien el experto en la técnica puede modificar esta configuración según sea necesario. De manera alternativa, el experto en la técnica puede utilizar otro algoritmo o programa informático que proporcione al menos el nivel de identidad o alineación proporcionado por los algoritmos y programas de referencia. Véase, por ejemplo, a J. D. Thompson et al., Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999).

[0054] También se encuentran disponibles múltiples programas de alineación de secuencias para secuencias de ácidos nucleicos. Ejemplos de dichos programas incluyen «Clustal Omega», «Clustal W», «CAP Sequence Assembly», «BLAST», «MAP» y «MEME», a los cuales se puede acceder a través de servidores web en internet. Los expertos en la técnica conocen otras fuentes para dichos problemas. De manera alternativa, también se usan servicios de Vector NTI. También existe una variedad de algoritmos conocidos en la técnica que se pueden usar para medir la identidad de secuencia, lo que incluye aquellos contenidos en los programas anteriormente descritos. Como otro ejemplo, es posible comparar secuencias de

polinucleótidos mediante el uso de Fasta™, un programa en GCG Versión 6.1. Fasta™ proporciona alineaciones y un porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de mejor superposición entre las secuencias de consulta y búsqueda. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre secuencias de ácido nucleico se puede determinar usando Fasta™ con sus parámetros predeterminados (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de puntuación) como se proporciona en GCG Versión 6.1, incorporada a la presente como referencia.

[0055] Las secuencias de ácido nucleico descritas en la presente pueden clonarse mediante el uso de técnicas de biología molecular de rutina, o generadas de novo mediante síntesis de ADN, que pueden llevarse a cabo con el uso de procedimientos de rutina mediante empresas de servicio que desarrollan actividades comerciales en el campo de la síntesis de ADN y/o clonación molecular (por ejemplo, GeneArt, GenScript, Life Technologies, Eurofins). Las secuencias de ácido nucleico que codifican el miARN o el ARNpn descrito en la presente se ensamblan y se colocan en cualquier elemento genético, por ejemplo, ADN no asociado a proteínas, fagos, trasposones, cósmidos, episomas, etc., que transfiere las secuencias que portan hacia una célula hospedadora, por ejemplo, para generar sistema de administración no virales (por ejemplo, sistemas a base de ARN, ADN no asociado a proteínas o similares) o para generar vectores virales en una célula hospedadora empaquetadora y/o para la administración a células hospedadoras en un sujeto. En una modalidad, el elemento genético es un vector. En una modalidad, el elemento genético es un plásmido. Los métodos utilizados para fabricar tales construcciones modificadas genéticamente son conocidos por las personas del oficio de nivel medio en la manipulación de ácidos nucleicos e incluyen diseño por ingeniería genética, diseño por ingeniería recombinante y técnicas de síntesis. Ver, por ejemplo, Green y Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

[0056] Debe entenderse que las secuencias codificantes de hLámina A descritas en la presente pretenden aplicarse a otras composiciones, regímenes, aspectos,

modalidades y métodos descritos a través de la Memoria descriptiva.

Casete de expresión y genoma del vector

[0057] Se proporciona en la presente una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia codificante de hLámina A modificada bajo el control de secuencias reguladoras que dirigen la expresión de la hLámina A madura funcional en una célula objetivo, también denominada casete de expresión. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende un marco de lectura abierto (ORF) para una secuencia codificante de hLámina A madura funcional que codifica un cola de extremo carboxi (C) de la preproteína que no tiene hLámina A madura funcional, donde el ORF se une operativamente a las secuencias de control reguladoras que dirigen la expresión de la proteína hLámina A funcional madura en una célula, y donde las secuencias de control reguladoras comprenden un promotor, o un promotor híbrido, opcionalmente un potenciador, y una secuencia de poliadenilación (poliA).

[0058] Tal como se usa en la presente, un «casete de expresión» se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico biológicamente útil (por ejemplo, un ADNc de gen que codifica una proteína, enzima u otro producto génico útil, ARNm, etc.) y secuencias reguladoras unidas de manera operativa a este que dirigen o modulan la transcripción, traducción y/o expresión de la secuencia de ácido nucleico y su producto génico. Como se utiliza en la presente, secuencias «operativamente unidas» incluyen secuencias reguladoras que son contiguas o no contiguas a la secuencia de ácido nucleico y secuencias reguladoras que actúan en secuencias de ácido nucleico trans o cis. Dichas secuencias reguladoras suelen incluir, por ejemplo, uno o más de un promotor, un potenciador, un intrón, una secuencia Kozak, una secuencia de poliadenilación y una señal TATA. El casete de expresión puede contener secuencias reguladoras antes (hacia 5') de la secuencia genética, por ejemplo, una o más de un promotor, un potenciador, un intrón, etc., y uno o más de un potenciador, o secuencias reguladoras posteriores (hacia 3') a una secuencia genética, por ejemplo, la región no traducida 3' (UTR 3') que comprende un sitio de poliadenilación, entre otros elementos. En determinadas modalidades, las

secuencias reguladoras se encuentran operativamente unidas a la secuencia de ácido nucleico de un producto génico, donde las secuencias reguladoras se separan de la secuencia de ácido nucleico de un producto génico mediante secuencias de ácido nucleico intervinientes, es decir, regiones no traducidas 5' (UTR 5'). En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende secuencias de ácido nucleico de uno o más productos génicos. En algunas modalidades, el casete de expresión puede ser un casete de expresión monocistrónico o un bicistrónico. En otras modalidades, el término «transgén» se refiere a una o más secuencias de ADN de una fuente exógena que se insertan en una célula objetivo.

[0059] Usualmente, dicho casete de expresión puede usarse para generar un vector viral y contiene la secuencia codificante para el producto génico descrito en la presente, flanqueada por señales de empaquetamiento del genoma vírico y otras secuencias de control de expresión, tal como las descritas en la presente. En determinadas modalidades, un genoma de vector puede contener dos o más casetes de expresión.

[0060] Según su uso para describir una proteína o secuencia de ácido nucleico, el término «exógeno» significa que la proteína o el ácido nucleico no se producen de forma natural en la posición en la cual existe en un cromosoma o una célula hospedadora. Una secuencia de ácido nucleico exógena también hace referencia, a una secuencia derivada de la misma célula hospedadora o sujeto e insertada en estos, pero presente en un estado no natural, por ejemplo, una cantidad de copias diferente, o bajo el control de elementos reguladores diferentes.

[0061] El casete de expresión puede contener secuencias reguladoras antes (hacia 5') de la secuencia genética, por ejemplo, una o más de un híbridas promotor, un potenciador, un intrón, etc., y uno o más de un promotor, un potenciador híbrido, o secuencias reguladoras posteriores (hacia 3') a una secuencia genética, por ejemplo, la región no traducida 3' (UTR 3') que comprende un sitio de poliadenilación (poliA), entre otros elementos.

[0062] En determinadas modalidades, las secuencias reguladoras comprenden uno o más de un promotor, un potenciador, un intrón, un factor de transcripción, un terminador de transcripción, una señal de procesamiento de ARN eficaz tal como señales de sitio de empalme y poliadenilación (poliA), una secuencia que estabiliza ARNm citoplasmático, por ejemplo, un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de marmota (WHP) (WPRE), y secuencias que potencian la eficacia de la traducción (es decir, secuencias de consenso de Kozak). En determinadas modalidades, el promotor seleccionado es un promotor constitutivo. En determinadas modalidades, el promotor es un promotor ubicuo. Por ejemplo, dichos promotores pueden incluir un promotor de betaactina de pollo (CB), híbrido de un potenciador temprano intermedio de citomegalovirus y el promotor de β -actina de pollo (un promotor CB7), un promotor de citomegalovirus humano (CMV), promotor de ubiquitina C (UbC), los promotores tempranos y tardíos de virus del simio 40 (SV40), promotor U6, promotores de metalotioneína, promotor EFl α , promotor ubiquitina, promotor de transferasa de fosforribosilo de hipoxantina (HPRT), promotor de reductasa de deshidrofolato (DHFR) (Scharfmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 88:4626-4630 (1991), promotor de adenosina desaminasa, un promotor de fosfoglicerol cinasa (PGK), un promotor de piruvato cinasa, un promotor de fosfoglicerol mutasa el promotor de β -actina (Lai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 86: 10006-10010 (1989)), repeticiones de extremo largas (LTR) del virus de la leucemia de Moloney y otros retrovirus, el promotor de timidina cinasa del virus simple del herpes y otros promotores constitutivos conocidos por aquellos expertos en la técnica.

[0063] En determinadas modalidades, el promotor es un promotor específico de tejidos o células. En determinadas modalidades, el promotor es un promotor específico cardíaco, por ejemplo, promotor de troponina cardíaca T (cTNT), desmina (DES), cadena pesada de alfa-miosina (α -MHC), cadena ligera 2 de miosina (MLC-2). Ver también Pacak, C.A., et al., Tissue specific promoters improve specificity of AAV9 mediated transgene expression following intra-vascular gene delivery in neonatal mice, Genetic Vaccines and Therapy 2008, 6:13. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende un promotor que es un promotor de troponina T cardíaca de

pollo (también conocida como TnT de pollo o chTnT). En determinadas modalidades, el promotor de chTnT comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 7. En determinadas modalidades, el promotor es un promotor híbrido. En determinadas modalidades, el promotor es un promotor cardíaco híbrido. Como se utiliza en la presente, la expresión «promotor híbrido» hace referencia a una secuencia de control reguladora que comprende un híbrido entre un potenciador, una secuencia espaciadora y una secuencia de promotor. En determinadas modalidades, el promotor cardíaco híbrido comprende una secuencia del potenciador IE de CMV, una secuencia espaciadora, un promotor de troponina T cardíaca de pollo. En determinadas modalidades, la secuencia espaciadora tiene menos del 100 % de identidad con respecto a la secuencia en los ejemplos en la presente. En determinadas modalidades, la secuencia espaciadora comprende al menos dos (2) a al menos diez (10) nucleótidos. En determinadas modalidades, la secuencia espaciadora tiene al menos nueve (9) nucleótidos. En determinadas modalidades, el espaciador comprende una secuencia de ácido nucleico «CAATAGCTT». En determinadas modalidades, la secuencia espaciadora comprende una secuencia de ácido nucleico «CA». En determinadas modalidades, la secuencia espaciadora se selecciona de forma tal que no codifica ningún elemento del genoma de proteína, péptido o vector. Ver también la solicitud de patente estadounidense n.º 63/293,678, presentada el 24 de diciembre de 2021, que se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad.

[0064] En determinadas modalidades, el promotor cardíaco híbrido comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 23. En determinadas modalidades, el promotor cardíaco híbrido comprende una secuencia de ácido nucleico al menos un 99 % idéntica con respecto a la SEQ ID NO: 23. Las variaciones en la secuencia de ácido nucleico del promotor cardíaco híbrido incluye sustituciones de nucleótidos en la secuencia espaciadora, y opcionalmente incluye una inserción y eliminación de nucleótidos en la secuencia espaciadora.

[0065] En una modalidad, la expresión del producto génico se controla mediante un promotor regulable que proporciona un control estrecho sobre la transcripción de la

secuencia que codifica el producto génico, por ejemplo, un agente farmacológico o factores de transcripción activados por un agente farmacológico o, en modalidades alternativas, señales fisiológicas. Se proporcionan sistemas de promotores que no se fugan y que pueden ser estrictamente controlados. Los ejemplos de promotores regulables que son complejos del factor de transcripción dependientes del ligando que incluyen, de forma no taxativa, los miembros de la superfamilia del receptor nuclear activada mediante sus respectivos ligandos (por ejemplo, glucocorticoide, estrógeno, progestina, retinoide, ecdisona y análogos y miméticos de estos) y rTTA activados por tetraciclina. En un aspecto, el cambio génico es un cambio génico a base de EcR. Los ejemplos de dichos sistemas incluyen, de forma no taxativa, los sistemas descritos en las patentes estadounidenses n.º 6,258,603, 7,045,315, solicitudes de patente estadounidenses publicadas n.º 2006/0014711, 2007/0161086 y solicitud publicada internacional n.º WO 01/70816. Los ejemplos de sistemas de receptor de ecdisona quimérico se describen en la patente estadounidense n.º 7,091,038, la patente estadounidense publicada n.º 2002/0110861, 2004/0033600, 2004/0096942, 2005/0266457 y 2006/0100416, y la solicitud internacional publicada n.º WO 01/70816, WO 02/066612, WO 02/066613, WO 02/066614, WO 02/066615, WO 02/29075 y WO 2005/108617, cada uno de los cuales se incorpora mediante referencia en su totalidad. Un ejemplo de un sistema regulado por agonista de ecdisona no esteroideo es el sistema de expresión inducible de mamífero RheoSwitch® (New England Biolabs, Ipswich, MA).

[0066] Sistemas de promotores aún adicionales pueden incluir elementos de respuesta que incluyen, de forma no taxativa, un elemento de respuesta a tetraciclina (tet) (tal como el descrito por Gossen y Bujard (1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 89:5547-551); o un elemento de respuesta a hormonas tales como las descritas por Lee et al. (1981, Nature 294:228-232); Hynes et al. (1981, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 78:2038- 2042); Klock et al. (1987, Nature 329:734-736); y Israel y Kaufman (1989, Nucl. Acids Res. 17:2589-2604) y otros promotores inducibles conocidos en la técnica. Estos elementos de respuesta pueden incluir un elemento de respuesta a la hipoxia (HRE) que une HIF- α y β , un elemento de respuesta a un ion metálico tal como el descrito en Mayo et al.

(1982, Cell 29:99-108); Brinster et al. (1982, Nature 296:39-42) y Searle et al. (1985, Mol. Cell. Biol. 5:1480-1489); o un elemento de respuesta al choque térmico tal como se describe en Nouer et al. (en: Heat Shock Response, ed. Nouer, L., CRC, Boca Raton, Fla., págs. 167-220, 1991).

[0067] Con el uso de dichos promotores, puede controlarse la expresión del transgén, por ejemplo, mediante el sistema Tet on/off (Gossen et al., 1995, Science 268:1766-9; Gossen et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89(12):5547-51); el sistema TetR-KRAB (Urrutia R., 2003, Genome Biol., 4(10):231; Deuschle U et al., 1995, Mol Cell Biol. (4):1907-14); el sistema regulable por mifepristona (RU486) (Geneswitch; Wang Y et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 91(17):8180-4; Schillinger et al., 2005, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 102(39): 13789-94); y el sistema regulable dependiente de tamoxifen humanizado (Roscelli et al., 2002, Mol. Ther. 6(5):653- 63).

[0068] En otro aspecto, el cambio génico se basa en heterodimerización de la proteína de unión a FK506 (FKBP) con proteína asociada a rapamicina de FKBP (FRAP) y se regula a través de rapamicina o sus análogos no inmunosupresores. Los ejemplos de dichos sistemas incluyen, de forma no taxativa, la tecnología transcripcional ARGENT™ (ARIAD Pharmaceuticals, Cambridge, Mass.) y los sistemas descritos en la patente estadounidense n.º 6,015,709, 6,117,680, 6,479,653, 6,187,757, y 6,649,595, la publicación estadounidense n.º 2002/0173474, la publicación estadounidense n.º 200910100535, la patente estadounidense n.º 5,834,266, la patente estadounidense n.º 7,109,317, la patente estadounidense n.º 7,485,441, la patente estadounidense n.º 5,830,462, la patente estadounidense n.º 5,869,337, la patente estadounidense n.º 5,871,753, la patente estadounidense n.º 6,011,018, la patente estadounidense n.º 6,043,082, la patente estadounidense n.º 6,046,047, patente estadounidense n.º 6,063,625, patente estadounidense n.º 6,140,120, patente estadounidense n.º 6,165,787, patente estadounidense n.º 6,972,193, patente estadounidense n.º 6,326,166, patente estadounidense n.º 7,008,780, patente estadounidense n.º 6,133,456, patente estadounidense n.º 6,150,527, patente estadounidense n.º 6,506,379, patente estadounidense n.º 6,258,823, patente

estadounidense n.º 6,693,189, patente estadounidense n.º 6,127,521, patente estadounidense n.º 6,150,137, patente estadounidense n.º 6,464,974, patente estadounidense n.º 6,509,152, patente estadounidense n.º 6,015,709, patente estadounidense n.º 6,117,680, patente estadounidense n.º 6,479,653, patente estadounidense n.º 6,187,757, patente estadounidense n.º 6,649,595, patente estadounidense n.º 6,984,635, patente estadounidense n.º 7,067,526, patente estadounidense n.º 7,196,192, patente estadounidense n.º 6,476,200, patente estadounidense n.º 6,492,106, WO 94/18347, WO 96/20951, WO 96/06097, WO 97/31898, WO 96/41865, WO 98/02441, WO 95/33052, WO 99110508, WO 99110510, WO 99/36553, WO 99/41258, WO 01114387, kit de plásmido de transcripción regulada ARGENT™, kit de transcripción regulada Takara Bio iDimerize o kits comparables de QuantiTect, Sensiscript, o similares, cada uno de los cuales se incorpora en la presente mediante referencia en su totalidad.

[0069] Estos sistemas se diseñan para ser inducidos por rapamicina o uno de sus análogos, a los que se hace referencia como «rapálogos». Se proporcionan ejemplos de rapamicinas adecuadas en los documentos enumerados anteriormente en relación con la descripción del sistema ARGENT™. En una modalidad, la molécula es rapamicina [por ejemplo, comercializado como Rapamune™ por Pfizer]. En otra modalidad, se utiliza un rapálogo conocido como AP21967 [ARIAD]. Los ejemplos de estas moléculas dimerizantes incluyen, de forma no taxativa, rapamicina, FK506, FK1012 (un homodímero de FK506), análogos de rapamicina (“rapálogos” que se preparan fácilmente mediante modificaciones químicas del producto natural para agregar una “protuberancia” que reduce o elimina la afinidad para FKBP y/o FRAP endógeno. Los ejemplos de rapálogos incluyen, de forma no taxativa, AP26113 (Ariad), AP1510 (Amara, J.F., et al., 1997, Proc Natl Acad Sci EUA, 94(20): 10618-23) AP22660, AP22594, AP21370, AP22594, AP23054, AP1855, AP1856, AP1701, AP1861, AP1692 y AP1889, con “protuberancias” modificadas que minimizan las interacciones con FKBP endógeno. Pueden seleccionarse aún otros rapálogos, por ejemplo, AP23573 [Merck]. En determinadas modalidades, la rapamicina o un análogo adecuado puede administrarse localmente o sistémicamente a las células

transfectadas por AAV.

[0070] En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende uno o más potenciadores de la expresión. En una modalidad, el casete de expresión contiene dos o más potenciadores de expresión. Dichos potenciadores pueden ser iguales o pueden ser diferentes entre sí. En determinadas modalidades, el potenciado es un potenciador temprano intermedio de citomegalovirus (potenciador IE CMV). En determinadas modalidades, el potenciador IE CMV comprende un ácido nucleico del SEQ ID NO: 8. En determinadas modalidades, el potenciador es un potenciador cardiaco. En determinadas modalidades, el potenciador cardiaco es un potenciador de troponina T de pollo. En determinadas modalidades, el potenciador es un potenciador pesado de α -miosina de rata. Este o estos potenciadores pueden estar presentes en dos copias que se ubican de forma adyacente entre sí. De manera alternativa, las copias duales del potenciador pueden estar separadas por una o más secuencias. En una modalidad adicional, se selecciona el o los potenciadores de uno o más de un potenciador de APB, un potenciador de ABPS, un potenciador mic/bik alfa, un potenciador de TTR, un potenciador de en34, un potenciador de ApoE, un potenciador de CMV o un potenciador de RSV. En una modalidad aún adicional, los elementos reguladores comprenden un intrón. En una modalidad adicional, se selecciona el intrón del intrón de beta actina (CBA) de pollo, beta globina humana, IVS2, SV40 (Promega), bGH, alfa-globulina, beta-globulina, colágeno, ovalbúmina o p53. Ver, por ejemplo, WO 2011/126808. En una modalidad, los elementos reguladores comprenden una poli A. En una modalidad adicional, la poliA es una poliA sintética o de hormona de crecimiento bovino (bGH), hormona de crecimiento humano (hGH), SV40, β -globina de conejo (RBG) o RBG modificada (mRBG). Opcionalmente, se pueden seleccionar una o más secuencias para estabilizar el ARNm. Un ejemplo de una secuencia tal es una secuencia de WPRE modificada, la cual se puede diseñar genéticamente antes de la secuencia de poliA y después de la secuencia codificante [ver, por ejemplo, MA Zanta-Boussif et al., Gene Therapy (2009) 16: 605-619].

[0071] En determinadas modalidades, los casetes de expresión pueden incluir uno o

más potenciadores de expresión tal como el elemento regulador postranscripcional de virus de hepatitis de castor (WPRE), humano (HPRE), ardilla (GPRE) o de ardilla ártica (AGSPRE), o un elemento regulador postranscripcional sintético. Estos elementos potenciadores de la expresión son particularmente ventajosos cuando se colocan en una UTR 3' y pueden aumentar significativamente la estabilidad del ARNm y/o rendimiento de la proteína. En determinadas modalidades, los casetes de expresión proporcionados incluyen una secuencia reguladora que es un elemento regulador postranscripcional del virus de la hepatitis de la marmota (WPRE) o una variante de este. Se proporcionan secuencias de WPRE adecuadas en los genomas de vector descritas en la presente y se conocen la técnica (por ejemplo, tal como aquellas que se describen en la patente estadounidense n.º 6,136,597, 6,287,814, y 7,419,829, que se incorporan a la presente). En determinadas modalidades, el WPRE es una variante que mutó para eliminar la expresión de la proteína X del virus de la hepatitis B de la marmota (WHX), inclusive, por ejemplo, mutaciones en el codón de inicio del gen WHX. Ver también Kingsman S.M., Mitrophanous K., y Olsen J.C. (2005), Potential Oncogene Activity of the Woodchuck Hepatitis Post-Transcriptional Regulatory Element (Wpre)." *Gene Ther.* 12(1):3-4; y Zanta-Boussif M.A., Charrier S., Brice-Ouzet A., Martin S., Opolon P., Thrasher A.J., Hope T.J., y Galy A. (2009), Validation of a Mutated Pre Sequence Allowing High and Sustained Transgene Expression While Abrogating Whv-X Protein Synthesis: Application to the Gene Therapy of Was, *Gene Ther.* 16(5):605-19, ambos de los cuales se incorporan a la presente en su totalidad mediante referencia. En otras modalidades, se seleccionan potenciadores de fuente viral anónima. En determinadas modalidades, no se encuentra presente WPRE.

[0072] En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende secuencias de control reguladoras que comprenden un promotor cardíaco. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende secuencias de control reguladora que comprende un promotor de troponina T cardíaca (cTnT). En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende secuencias de control reguladoras que comprenden un promotor cardíaco híbrido que comprende un potenciador IE CMV, una secuencia espaciadora y un promotor de troponina T cardíaca de pollo (chTnT)

con. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende chTnT que comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 7 con un potenciador IE CMV que comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 8. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende el promotor cardiaco híbrido que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 23 o una secuencia al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 23. En determinadas modalidades, las secuencias de control reguladora comprende una secuencia de poliA que es una secuencia de poliA de beta globina de conejo. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de poliA de betaglobina de conejo que comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 9. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende un promotor de chTnT - opcionalmente con un potenciador IE CMV - una secuencia codificante de hLámina A - poli A de betaglobina de conejo.

[0073] En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende, de 5' a 3', un potenciador IE CMV, promotor de chTnT, secuencia codificante de hLámina A y poliA de betaglobina de conejo. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2, o una secuencia al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2. En determinadas modalidades, el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % a al menos un 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

[0074] En determinadas modalidades, el casete de expresión es CMVe.chTNTp.Lámina.RBG que comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2.

[0075] En determinadas modalidades, el casete de expresión que comprende la secuencia codificante de hLámina A y puede incluir otras secuencias reguladoras de este. Las secuencias reguladoras necesarias están unidas de manera operativa a la secuencia codificante de la hLámina A de manera que permita su transcripción, traducción y/o expresión en una célula objetivo.

[0076] En un aspecto adicionalmente, se proporciona a la presente un genoma del vector que comprende una repetición terminal invertida (ITR) 5' de AAV, un casete de expresión y una ITR 3' de AAV, donde el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un gen de hLámina A madura funcional operativamente unida a las secuencias de control de la expresión que dirige la expresión de estos en una célula que comprende el gen seleccionado.

[0077] En determinadas modalidades, el genoma del vector comprende una secuencia de ácido nucleico modificad que comprende un marco de lectura abierto (ORF) para una secuencia codificante de hLámina A madura funcional que codifica la cola de extremo carboxi (C) de la preproteína que no tiene hLámina A madura funcional, donde el ORF se une operativamente a las secuencias de control reguladoras que dirigen la expresión de la proteína hLámina A funcional madura en una célula, y donde las secuencias de control reguladora comprende un promotor, opcionalmente un potenciador, y una secuencia de poliadenilación (poliA).

[0078] En determinadas modalidades, el genoma del vector comprende un casete de expresión que tiene una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia al menos alrededor de un 90 % idéntica con respecto a la SEQ ID NO: 2. En determinadas modalidades, el genoma del vector comprende una molécula de ácido nucleico que comprende, 5' a 3', una ITR de AAV5' - promotor cardiaco híbrido - una secuencia codificante de hLámina A modificada - poli A de beta globina de conejo - IT de AAV3'. En determinadas modalidades, el genoma del vector comprende una molécula de ácido nucleico que comprende, 5' a 3', una ITR- Opcionalmente CMV ITR de AAV5' - promotor secuencia espaciadora - híbrido - una secuencia codificante de hLámina A modificada - poli A de beta globina de conejo - IT de AAV3'. En determinadas modalidades, el genoma de vector comprende una molécula de ácido nucleico que comprende, 5' a 3', ITR de AAV5' - promotor IE CMV - secuencia espaciadora - promotor de chTnT - secuencia codificante de hLámina A modificada - poliA de betaglobina de conejo - ITR de AAV3'. En determinadas modalidades, el genoma del vector comprende secuencias de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1. En

determinadas modalidades, el genoma de vector comprende una secuencia de ácido nucleico de al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 al menos un 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

[0079] En determinadas modalidades, el genoma de vector es 5TTR.CMVe.chTNTp.Lámina.RBG.3'ITR que comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1, donde el "CMVe.chTNTp" hace referencia al promotor cardiaco híbrido que comprende un potenciador IE CMV, una secuencia espaciadora y un promotor de troponina T cardiaca.

[0080] En determinadas modalidades, la célula objetivo es una célula de tejido cardiaco. En determinadas modalidades, la célula objetivo es una célula cardiaca. En determinadas modalidades, la célula objetivo es cualquier otra célula que expresa una proteína de Lámina A madura funcional en un sujeto sin DCM idiopática o una enfermedad asociada con una mutación en un gen LMNA.

[0081] Como se usa en la presente, un «genoma del vector» se refiere a la secuencia de ácidos nucleicos empaquetada dentro de una cápside de parvovirus (por ejemplo, rAAV) que forma una partícula viral. Una secuencia de ácido nucleico tal contiene secuencias de repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV. En los ejemplos de la presente, un genoma de vector contiene, como mínimo, de 5' a 3', una ITR de AAV 5' (también designada como ITR 5'), una o más secuencias codificantes (es decir, uno o más transgenes) y una ITR de AAV 3' (también designada como ITR 3'). Pueden seleccionarse ITR de AAV2, un AAV de fuente diferente que la cápside, u otras ITR de longitud completa. En determinadas modalidades, las ITR son de la misma fuente de AAV que la AAV que proporciona la función de rep durante la producción o un AAV transcomplementario. Además, se pueden usar otras ITR, por ejemplo, las ITR autocomplementarias (scAAV). Se encuentran comprendidos AAV monocatenarios y AAV autocomplementarios (sc) con el rAAV. El transgén es una secuencia codificante de ácido nucleico, heteróloga a las secuencias de vector, que codifica un polipéptido, una proteína, una molécula de ARN funcional (por ejemplo, miARN, inhibidor de miARN) u otro producto génico, de interés. La secuencia codificante de ácido nucleico

está operativamente ligada a componentes reguladores de una manera que permite la transcripción, traducción y/o expresión de transgenes en una célula de un tejido objetivo. Los componentes adecuados de un genoma de vector se tratan en más detalle en la presente. En un ejemplo, un «genoma de vector» contiene, como mínimo, de 5' a 3', una secuencia específica de vector, una secuencia de ácido nucleico que codifica hLámina A operativamente unida a secuencias de control reguladoras (que dirigen su expresión en una células objetivo), donde la secuencia específica de vector puede ser una secuencia de repetición terminal que empaqueta específicamente el genoma del vector en una cápside o proteína de empaquetamiento de un vector viral. Por ejemplo, las repeticiones de extremo invertidas del AAV se utilizan para el empaquetamiento en la cápside del AAV y de algunos otros parvovirus. En determinadas modalidades, el genoma del vector es un casete de expresión que tiene secuencias de repetición terminal invertida (ITR) necesarias para empaquetar el genoma del vector en la cápside de AAV en los extremos 5' y 3' y que contiene entre ellos un gen hLáminaA como el descrito en la presente, unido de forma operable a secuencias que dirigen la expresión de este. En determinadas modalidades, un genoma del vector puede comprender, como mínimo, de 5' a 3', una secuencia codificante ITR de AAV en 5', y una ITR de AAV en 3'. En ciertas modalidades, las ITR son de AAV2, una fuente de AAV diferente de la cápside o ITR que no estén completas. En determinadas modalidades, las ITR son de la misma fuente de AAV que la AAV que proporciona la función de rep durante la producción o un AAV transcomplementario. Además, se pueden usar otras ITR.

[0082] Las secuencias de AAV del vector típicamente comprenden las secuencias de repeticiones terminales invertidas en 5' y 3' que actúan en cis (ver, por ejemplo, B. J. Carter, en "Handbook of Parvoviruses", P. Tijsser, CRC Press, págs. 155 168 (1990)). Las secuencias de ITR tienen alrededor de 145 bp de longitud. Preferentemente, prácticamente la totalidad de las secuencias que codifican las ITR se utilizan en la molécula, aunque se puede permitir cierto grado de modificación leve de estas secuencias. La capacidad de modificar estas secuencias de ITR se encuentra dentro de los conocimientos de la técnica. (Ver, por ejemplo, textos tales como Sambrook et

al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1989); y K. Fisher et al., J. Virol., 70:520-532 (1996)). Un ejemplo de dicha molécula empleada es un plásmido «que actúa en cis» que contiene el transgén, en el que la secuencia transgénica seleccionada y los elementos reguladores asociados se encuentran flanqueados por las secuencias de ITR de AAV en 5' y 3'. En una modalidad, las ITR son de un AAV diferente del que suministra una cápside. En una modalidad, las secuencias de ITR de AAV2. Sin embargo, se pueden seleccionar ITR de otras fuentes de AAV. Se ha descrito una versión abreviada de la ITR 5', denominada AITR, en la que se eliminan la secuencia D y el sitio de resolución terminal (trs). En determinadas modalidades, el genoma del vector incluye una ITR acortada de AAV2 de 130 pares de bases, en donde se eliminan los elementos "A" externos. Sin desear limitarse a la teoría, se cree que la ITR acortada regresa a la longitud del tipo salvaje de 145 pares de bases durante la amplificación de ADN del vector con el uso del elemento interno (A') como una plantilla. En otras modalidades, se utilizan las ITR 5' y 3' de AAV de longitud completa. En los casos en los que la fuente de las ITR proviene del AAV2 y la cápside AAV proviene de otra fuente de AAV, el vector resultante puede considerarse «pseudotipado». Sin embargo, otras configuraciones de estos elementos pueden ser adecuadas.

[0083] Debe entenderse que las composiciones en el casete de expresión y los genomas del vector descritos en la presente pretenden ser aplicables a otras composiciones, regímenes, aspectos, modalidades y métodos descritos en la Memoria descriptiva.

Vector

[0084] En un aspecto, se proporciona en la presente un vector que comprende un marco de lectura abierto (ORF) modificado para Lámina A madura (hLámina A), donde el ORF tiene una secuencia codificante de hLámina A madura, que es una secuencia de ácido nucleico que codifica una Lámina A humana madura funcional (hLáminaA) que no tiene la cola de extremo carboxi (C) de la preproteína, donde el ORF se une operativamente a las secuencias de control reguladoras que dirigen la expresión de la

hLáminaA madura en una célula, donde la secuencia codificante de hLáminaA comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de ácido nucleico al menos un 90 % idéntica con respecto a la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de ácido nucleico al menos un 90 % idéntica con respecto a la SEQ ID NO: 5, y donde las secuencias de control reguladoras incluyen un promotor específico cardíaco.

[0085] En determinadas modalidades, el vector comprende una secuencia codificante de hLámina A que comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de al menos un 90 %, al menos el 95 % idéntica, al menos el 97 % idéntica, al menos el 98 % idéntica, o el 99 % al 100 % idéntica con respecto a la SEQ ID NO: 4 y que expresa la proteína hLámina A madura funcional. En determinadas modalidades, el vector comprende una secuencia codificante de hLámina A que comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 4 o una secuencia de ácido nucleico al menos un 90 % (por ejemplo, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o al menos un 99,9 %) idéntica a esta que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

[0086] Un “vector” tal como se usa en la presente es un resto biológico o químico que comprende una secuencia de ácido nucleico que se puede introducir en una célula objetivo apropiada para la replicación o expresión de dicha secuencia de ácido nucleico. Ejemplos de un vector incluyen, de modo no taxativo, un virus recombinante, un plásmido, lipoplejos, un polimersoma, poliplejos, un dendrímero, un conjugado de péptidos que penetran células (CPP), una partícula magnética, o una nanopartícula. En una modalidad, un vector es una molécula de ácido nucleico en la que puede insertarse un ácido nucleico heterólogo, exógeno o modificado que codifica un SGSH funcional, que puede entonces introducirse en una célula objetivo adecuada. Tales vectores tienen preferentemente uno o más orígenes de replicación y uno o más lugares en los cuales puede insertarse el ADN recombinante. Los vectores suelen contar con medios a través de los cuales se pueden seleccionar las células con

vectores entre aquellas sin vectores, por ejemplo, codifican genes de resistencia a fármacos. Los vectores comunes incluyen plásmidos, genomas virales y «cromosomas artificiales». Se encuentran disponibles métodos convencionales de generación, producción, caracterización o cuantificación de los vectores para un experto en la técnica.

[0087] En una modalidad, el vector es un plásmido no viral que comprende un casete de expresión descrito en el mismo, por ejemplo, «ADN no relacionado con proteínas», «ADN plasmídico no relacionado con proteínas», ARN y ARNm; acoplado con varias composiciones y nanopartículas, que incluyen, por ejemplo, micelas, liposomas, composiciones catiónicas de lípidos y ácidos nucleicos, composiciones de poliglicanos y otros polímeros, conjugados de lípidos y/o de ácidos nucleicos a base de colesterol, y otras construcciones como las que se describen en la presente. Ver, por ejemplo, X. Su, et al., Mol. Pharmaceutics, 2011, 8 (3), págs. 774-787; publicación en línea: 21 de marzo de 2011; WO2013/182683, WO 2010/053572 y WO 2012/170930, todos los cuales se incorporan a la presente mediante esta referencia.

[0088] En determinadas modalidades, el vector descrito en la presente es un «virus con replicación defectuosa» o un «vector viral» que hace referencia a una partícula viral sintética o artificial en la que un casete de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica hLámina A se encuentra empaquetada en una cápside o envoltura viral, donde cualquier secuencia genómica viral también empaquetada dentro de la cápside o envoltura viral tienen una deficiencia en la replicación; es decir, no pueden generar viriones de progenie, pero retienen la capacidad para infectar las células objetivo. En una modalidad, el genoma del vector viral no incluye genes que codifiquen las enzimas requeridas para la replicación (el genoma puede modificarse genéticamente para ser «*sin agallas*» - que contenga solamente la secuencia de ácido nucleico que codifica hLámina A flanqueado por las señales necesarias para la amplificación y empaquetado del genoma artificial), pero es posible administrar estos genes durante la producción. Por lo tanto, se considera seguro para su uso en genoterapia, ya que los viriones descendientes no pueden replicarse e infectar, salvo

en presencia de la enzima vírica que se necesita para la replicación.

[0089] Como se utilizan en la presente, un vector de un virus recombinante es un virus adenoasociado (AAV), un adenovirus, un bocavirus, un AAV híbrido/bocavirus, un virus del herpes simple o un lentivirus.

[0090] Tal como se usa en la presente, el término «célula hospedadora» puede hacer referencia a la línea celular de empaquetado en la cual se produce un vector (por ejemplo, un AAV recombinante). Una célula hospedadora puede ser una célula procariota o eucariota (por ejemplo, de humano, de insecto o levadura) que contiene ADN exógeno o heterólogo introducido en la célula utilizando cualquier medio, por ejemplo, electroporación, precipitación con fosfato cálcico, microinyección, transformación, infección viral, transfección, suministro de liposomas, técnicas de fusión de membrana, gránulos recubiertos con ADN a gran velocidad, infección viral y fusión de protoplastos. Ejemplos de células hospedadoras pueden incluir, de modo no taxativo, una célula aislada, un cultivo celular, una célula *Escherichia coli*, una célula de levadura, una célula humana, una célula no humana, una célula de mamífero, una célula no de mamífero, una célula de insecto, una célula HEK-293, una célula de hígado, una célula de riñón, una célula del sistema nervioso central, una célula cardíaca o una célula madre.

[0091] Se debe entender que las composiciones en el vector descrito en la presente pretenden ser aplicadas a otras composiciones, regímenes, aspectos, modalidades y métodos descritos a lo largo de la memoria descriptiva.

Virus adenoasociado recombinante (rAAV)

[0092] Se proporciona en la presente un virus adenoasociado recombinante (rAAV) útil para el tratamiento de una cardiopatía dilatada idiopática o una enfermedad asociada con un gen LMNA disfuncional, por ejemplo, tal como causado por una mutación de pérdida de función parcial o total. El rAAV comprende (a) una cápside de AAV; y (b) un genoma del vector empaquetado en la cápside de AAV de (a). De manera

adecuada, la cápside del AAV seleccionada se dirige a las células que se van a tratar. En determinadas modalidades, la cápside es del subtipo F. Sin embargo, en determinadas modalidades, puede seleccionarse otra fuente de cápside de AAV, es decir, subtipo A. En determinadas modalidades, la cápside de AAV es una cápside AAVhu68. En determinadas modalidades, la cápside de AAV es una cápside de AAVh95. En determinadas modalidades, la cápside de AAV es una cápside de AAVhu96. El genoma del vector comprende una repetición terminal invertida (ITR) de AAV 5', una secuencia de ácido nucleico modificada que codifica una hLámina A madura funcional como se describe en la presente, una secuencia reguladora que dirige la expresión de hLámina A en una célula objetivo, y una ITR de AAV'3.

[0093] En un aspecto, la rAAV.hLáminaA es para usar en el tratamiento de DCM idiopático. En determinadas modalidades, la rAAV.hLáminaA es para usar en el tratamiento de la DCM idiopática de inicio temprano. En determinadas modalidades, la rAAV.hLáminaA es para usar en el tratamiento de la DCM idiopática de inicio en adultos. En determinadas modalidades, el rAAV comprende un genoma del vector que comprende ITR de AAV 5', un casete de expresión y ITR de AAV 3', donde el casete de expresión comprende una secuencia de ácido nucleico modificad que comprende un marco de lectura abierto (ORF) para una secuencia codificante de hLámina A madura funcional que codifica la cola de extremo carboxi (C) de la preproteína que no tiene hLámina A madura funcional, donde el ORF se une operativamente a las secuencias de control reguladoras que dirigen la expresión de la proteína hLámina A funcional madura en una célula, y donde las secuencias de control reguladora comprende un promotor, opcionalmente un potenciador, y una secuencia de poliadenilación (poliA) (rAAV.hLáminaA). En determinadas modalidades, el rAAV comprende el genoma de vector comprende un casete de expresión que tiene una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2 o una secuencia al menos alrededor de un 90 % idéntica con respecto a la SEQ ID NO: 2. [0094] En determinadas modalidades, el rAAV comprende el genoma de vector que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende, 5' a 3', ITR de AAV5' - promotor cardíaco híbrido - una secuencia codificante de hLámina A modificada - poli A de beta globina de conejo

- ITR de AAV3'. En determinadas modalidades, el rAAV comprende un genoma de vector que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende, 5' a 3', una ITR de AAV5' - opcionalmente un promotor IE CMV - opcionalmente una secuencia espaciadora - promotor de chTnT - secuencia codificante de hLámina A modificada - poliA de betaglobina de conejo - ITR de AAV3'. En determinadas modalidades, el rAAV comprende un genoma que comprende una vector comprende una molécula de ácido nucleico que comprende, 5' a 3', ITR de AAV5' - promotor IE CMV - secuencia espaciadora - promotor de chTnT - secuencia codificante de hLámina A modificada - poliA de betaglobina de conejo - ITR de AAV3'. En determinadas modalidades, el rAAV comprende un genoma de vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 98 %, al menos un 99 a al menos un 100 % idéntico a la SEQ ID NO: 1 (rAAV.CMV-IE.chTnTp.LáminaA.RBG).

[0095] En determinadas modalidades, la cápside de AAV para las composiciones y métodos descritos en la presente se elige en función de la célula objetivo. En determinadas modalidades, la cápside de AAV es una cápside de AAV9hu68. En determinadas modalidades, puede elegirse otra cápside de AAV.

[0096] En determinadas modalidades, la cápside de AAV subtipo F es una cápside AAVhu68 [Ver, por ejemplo, US2020/0056159; PCT/US21/55436; SEQ ID NO: 10 y 11 para la secuencia de ácido nucleico; la SEQ ID NO: 12 para la secuencia de aminoácidos], una cápside AAVhu95 [Ver, por ejemplo, la solicitud provisional estadounidense n.º 63/251,599, presentada el 2 de octubre de 2201; SEQ ID NO: 13 y 14 (secuencia de ácido nucleico de hu95) y la SEQ ID NO: 15 (secuencia de aminoácidos de hu95), una cápside de AAVhu96 [Ver, por ejemplo, solicitud provisional estadounidense n.º 63/251,599, presentada el 2 de octubre de 2201; SEQ ID NO: 16 y 17 (secuencia de ácido nucleico de hu96) y la SEQ ID NO: 18 (secuencia de aminoácidos de hu96) o AAV9 [Ver, por ejemplo, US 7,906,111] o mutantes modificados y variantes de estos [ver, por ejemplo, W02020/200499; W02003/054197], ver también la solicitud de patente internacional n.º PCT/US2022/077315, presentada

el 30 de septiembre de 2022, que se incorpora en la presente mediante referencia en su totalidad.

[0097] En determinadas modalidades, la cápside del AAV es una cápside que no es del subtipo F, por ejemplo, una cápside del subtipo A, B, C, D o E. En determinadas modalidades, la cápside que no es del subtipo F es un AAV1 o una variación de este. En determinadas modalidades, la cápside de AAV transduce una célula objetivo diferente a las células cardíacas. En determinadas modalidades, la cápside del AAV es una cápside del subtipo A (por ejemplo, AAV1, AAV6, AAVrh91), una cápside del subtipo B (por ejemplo, AAV 2), una cápside del subtipo C (por ejemplo, hu53), una cápside del subtipo D (por ejemplo, AAV7), o una cápside del subtipo E (por ejemplo, rh10).

[0098] Tal como se usa en la presente, el término “subtipo” con referencia a grupos de AAV hace referencia a un grupo de AAV filogenéticamente relacionados entre sí, como se determina con un algoritmo de Neighbor-Joining con un valor bootstrap de al menos 75 % (de al menos 1000 copias) y una medida de distancia de corrección de Poisson de no más de 0,05 en función de la alineación de la secuencia de aminoácidos de vp1 de AAV. El algoritmo de unión de vecinos se ha descrito en la bibliografía. Ver, por ejemplo, M. Nei y S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics* (Oxford University Press, Nueva York (2000)). Se encuentran disponibles programas informáticos que se pueden usar para implementar este algoritmo. Por ejemplo, el programa MEGA v2.1 implementa el método Nei-Gojobori modificado. Usando estas técnicas y programas informáticos, y la secuencia de una proteína de la cápside vp1 de AAV, un experto en la técnica puede determinar fácilmente si un AAV seleccionado está contenido en uno de los subtipos identificados en la presente, en otro subtipo o fuera de estos subtipos. Ver, por ejemplo, G Gao, et al., *J Virol*, junio de 2004; 78(10): 6381-6388, que identifica los subtipos A, B, C, D, E y F, y proporciona secuencias de ácido nucleico de AAV novedosos, con los números de registro GenBank AY530553 a AY530629. Ver también, WO 2005/033321.

[0099] Un rAAV está compuesto de una cápside de AAV y un genoma del vector. Una

cápside de AAV es un ensamblaje de una población heterogénea de proteínas vp1, una población heterogénea de vp2 y una población heterogénea de vp3. Tal como se usa en la presente, cuando se usa con referencia a proteínas de cápside de vp, el término “heterogéneo” o cualquier variación de este hacen referencia a una población que consiste en elementos que no son iguales, por ejemplo, con monómeros vp1, vp2 o vp3 (proteínas) con secuencias de aminoácidos modificadas diferentes.

[0100] Tal como se usa en la presente, cuando se usa con referencia a proteínas de cápside de vp, el término «heterogéneo» o cualquier variación de este hacen referencia a una población que consiste en elementos que no son iguales, por ejemplo, con monómeros vp1, vp2 o vp3 (proteínas) con secuencias de aminoácidos modificadas diferentes. El término «población heterogénea» utilizado en relación con las proteínas vp1, vp2 y vp3 (denominadas alternativamente isoformas), se refiere a las diferencias en la secuencia de aminoácidos de las proteínas vp1, vp2 y vp3 dentro de una cápside. La cápside de AAV contiene subpoblaciones en las proteínas vp1, en las proteínas vp2 y en las proteínas vp3, las cuales tienen modificaciones con respecto a los residuos de aminoácidos previstos. Estas subpoblaciones incluyen, como mínimo, determinados residuos de asparagina (N o Asn) desamidados. Por ejemplo, ciertas subpoblaciones comprenden al menos una, dos, tres o cuatro posiciones de asparaginas (N) altamente desamidadas en pares de asparagina - glicina y, opcionalmente, comprenden además otros aminoácidos desamidados, en donde la desamidación resulta en un cambio de aminoácido y otras modificaciones opcionales.

[0101] En determinadas modalidades, se proporcionan cápsides de AAV que tienen una población heterogénea de isoformas de cápside de AAV (es decir, VP1, VP2, VP3) que contienen múltiples posiciones «NG» altamente desamidadas. En ciertas modalidades, las posiciones altamente desamidadas se encuentran en las ubicaciones identificadas a continuación, con referencia a la secuencia de aminoácidos predicha de la VP1 de longitud completa. En otras modalidades, el gen de la cápside se modifica de manera que la «NG» referenciada se retira y una «NG» mutante se diseña genéticamente en otra posición.

[0102] Tal como se utiliza en la presente, los términos «célula objetivo» y «tejido objetivo» pueden referirse a cualquier célula o tejido que esté destinado a ser transducido por el vector AAV en cuestión o en el cual se desea la expresión de hLáminaA. El término puede referirse a uno o más de los músculos, hígado, pulmón, epitelio de las vías respiratorias, sistema nervioso central, neuronas, ojo (células oculares) o corazón. En determinadas modalidades, la expresión «célula objetivo» pretende hacer referencia a las células del sujeto que se encuentra en tratamiento por Lámina A idiopática o una enfermedad relacionada con una mutación en un gen LMNA. En determinadas modalidades, el vector se administra a una célula objetivo ex vivo. En determinadas modalidades, el vector se administra a la célula objetivo in vivo.

[0103] Además, se proporciona en la presente un sistema de producción de rAAV útil para producir un rAAV como se describe en la presente. El sistema de producción comprende un cultivo celular que comprende (a) una secuencia de ácido nucleico codificante de una proteína de la cápside del AAV; (b) el genoma del vector; y (c) suficientes funciones de rep del AAV y funciones de ayuda para permitir el empaquetamiento del genoma del vector en la cápside del AAV. En determinadas modalidades, el genoma del vector es la SEQ ID NO: 1. En determinadas modalidades, el cultivo celular es un cultivo celular de riñón embrionario humano 293. [0107] En determinadas modalidades, la rep de AAV es de un AAV diferente. En determinadas modalidades, en donde la AAV rep es de AAV2. En determinadas modalidades, la secuencia codificadora del AAV rep y los genes cap están en la misma molécula de ácido nucleico, en donde hay opcionalmente un espaciador entre la secuencia rep y el gen cap.

[0104] Para su uso en la producción de un vector vírico de AAV (por ejemplo, un AAV recombinante (r)), es posible transportar los genomas del vector en cualquier vector adecuado, por ejemplo, un plásmido, que se administre a una célula hospedadora de empaquetamiento. Los plásmidos útiles en la presente invención se pueden modificar genéticamente, de modo que sean adecuados para la replicación y el empaquetamiento in vitro en células procariotas, células de insectos, células de

mamíferos, entre otros. Las técnicas de transfección y las células hospedadoras para empaquetamiento adecuadas son conocidas para el experto en la técnica o este puede diseñarlas fácilmente.

[0105] En determinadas modalidades, se proporciona un plásmido útil para la producción de una partícula de rAAV que comprende un genoma de vector que comprende una IT de AAV 5', un casete de expresión y una ITR de AAV3', donde el casete de expresión comprende la secuencia de ácido nucleico modificado que comprende un marco de lectura abierto (ORF) para una secuencia codificante de hLámina A madura funcional que codifica hLámina A madura funcional que no tiene la cola de extremo carboxi (C) de la preproteína, donde el ORF se une operativamente a las secuencias de control reguladoras que dirigen la expresión de la proteína hLámina A funcional madura en una célula, y donde las secuencias de control reguladora comprende un promotor, opcionalmente un potenciador y unas secuencias de poliadenilación (poliA). En determinadas modalidades, un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) útil en la producción de rAAV comprende un genoma de vector que comprende una ITR de AAV5', un promotor cardíaco híbrido (que comprende un potenciador IE CMV, una secuencia espaciadora y un promotor de chTnT), una secuencia codificante de hLámina A madura funcional, una secuencia de poliA de betaglobina de conejo y una ITR de AAV3'. En determinadas modalidades, un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) útil en la producción de rAAV comprende un genoma de vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1.

[0106] Los métodos para generar y aislar AAV adecuados para el uso como vectores se conocen en la técnica. Ver, en general, por ejemplo, Grieger y Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications", *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145; Buning et al., 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology", *J. Gene Med.* 10:717-733; y las referencias citadas más adelante, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Tal y como se utiliza en la

presente, un vector de terapia génica se refiere a un rAAV tal y como se describe en la presente, que es adecuado para su uso en el tratamiento de un paciente. Para el empaquetamiento de un gen en viriones, las ITR son los únicos componentes de AAV necesarios en cis en la misma construcción que la molécula de ácido nucleico que contiene el o los genes. Los genes cap y rep se pueden proporcionar en trans.

[0107] En una modalidad, el elemento genético seleccionado se puede administrar a una célula de empaquetamiento de AAV mediante cualquier método adecuado, inclusive transfección, electroporación, administración liposómica, técnicas de fusión de membrana, gránulos revestidos con ADN a alta velocidad, infección vírica y fusión de protoplastos. También es posible elaborar células de empaquetamiento de AAV estables. Los expertos en manipulación de ácidos nucleicos conocen métodos que se utilizan para producir dichas construcciones, incluidas modificación genética, modificación recombinante y técnicas de síntesis. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

[0108] Las expresiones «intermedio de AAV» o «intermedio de vector de AAV» hace referencia a una cápside de rAAV ensamblada que carece de las secuencias genómicas deseadas empaquetadas en esta. También es posible denominarlas cápsides «vacías». Tal cápside puede contener secuencias genómicas de un casete de expresión, que no son detectables, o secuencias genómicas solo parcialmente empaquetadas, que no son suficientes para lograr la expresión del producto génico. Estas cápsides vacías no son funcionales para transferir el gen de interés a una célula hospedadora.

[0109] El virus adenoasociado (AAV) recombinante que se describe en la presente puede generarse a través de técnicas conocidas. Ver, por ejemplo, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2. Tal método implica cultivar una célula hospedadora que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína de cápside de AAV; un gen funcional de rep; un casete de expresión compuesto, como mínimo, de repeticiones terminales invertidas (ITR) de AAV y un

transgén; y suficientes funciones auxiliares para permitir el empaquetamiento del casete de expresión en la proteína de cápside de AAV. Se han descrito métodos de generación de cápsides, secuencias de codificación para estas y métodos para la producción de vectores virales de rAAV. Véase, por ejemplo, Gao, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 100 (10), 6081-6086 (2003) y US 2013/0045186A1.

[0110] En una modalidad, se proporciona un cultivo celular de producción útil para producir un AAV recombinante que tiene una cápside seleccionada de AAVhu68, AAVhu95 o AAVhu96. Dicho cultivo celular contiene un ácido nucleico que expresa la proteína de cápside AAVhu68 en la célula hospedadora (por ejemplo, la SEQ ID NO: 10 o la SEQ ID NO: 11; una molécula de ácido nucleico adecuada para el empaquetamiento en la cápside de AAVhu68, por ejemplo, un genoma de vector que contiene ITR de AAV y una secuencia de ácido nucleico no AAV que codifica un gen operativamente unido a las secuencias reguladoras que dirigen la expresión directa del gen en una célula hospedadora; y funciones de rep de AAV y funciones auxiliares de adenovirus suficientes para permitir el empaquetamiento del genoma de vector en el AAVhu68 recombinante, o la cápside de AAVhu95 (por ejemplo, la SEQ ID NO: 13 o la SEQ ID NO: 14), cápside de AAVhu96 (por ejemplo, SEQ ID NO: 16 o la SEQ ID NO: 17). En una modalidad, el cultivo celular está compuesto por células de mamífero (por ejemplo, células 293 de riñón embrionario humano, entre otras) o células de insecto (por ejemplo, células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9)). En determinadas modalidades, el baculovirus proporciona las funciones auxiliares necesarias para empaquetar el genoma del vector en la cápside recombinante AAVhu68, AAVhu95 o AAVhu96.

[0111] Opcionalmente, se proporcionan las funciones rep por un AAV diferente a AAV2, seleccionado para complementar la fuente de las ITR.

[0112] En una modalidad, las células se fabrican en un cultivo celular adecuado (por ejemplo, HEK 293 o Sf9) o suspensión. Los métodos para fabricar los vectores para la terapia génica que se describen en la presente incluyen métodos conocidos en la técnica, tales como la generación de ADN plasmídico usado para la producción de los

vectores para la terapia génica, la generación de los vectores y la purificación de los vectores. En algunas modalidades, el vector para la genoterapia es un vector de AAV y los plásmidos generados son un plásmido cis de AAV que codifica el genoma del AAV y el gen de interés, un plásmido trans de AAV que contiene genes rep y cap del AAV y un plásmido auxiliar del adenovirus. El proceso de generación del vector puede incluir etapas del método tales como el inicio de un cultivo celular, el pasaje de células, la siembra de células, la transfección de células con el ADN plasmídico, el intercambio del medio posterior a la transfección a medio libre de suero y la recolección de medios de cultivo y células que contengan el vector. En la presente se hace referencia a los medios de cultivo y las células que contienen el vector como «recolección de células en bruto». En aún otro sistema, los vectores para genoterapia se introducen en células de insectos mediante infección con vectores de baculovirus. En general, es posible hallar reseñas de estos sistemas de producción, por ejemplo, en Zhang et al., 2009, Adenovirus-Adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant Adeno-associated virus production, Human Gene Therapy 20:922-929, cuyo contenido se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad. También se describen métodos para producir y usar estos y otros sistemas de producción de AAV en las siguientes patentes estadounidenses, cuyo contenido se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad: patentes estadounidenses n.º 5,139,941; 5,741,683; 6,057,152; 6,204,059; 6,268,213; 6,491,907; 6,660,514; 6,951,753; 7,094,604; 7,172,893; 7,201,898; 7,229,823; y 7,439,065.

[0113] Posteriormente, la recolección de células en bruto puede someterse a etapas del método, tales como la concentración de la recolección del vector, la diafiltración de la recolección del vector, la microfluidización de la recolección del vector, la digestión de nucleasas de la recolección del vector, la filtración del producto intermedio microfluidizado, la purificación en bruto mediante cromatografía, la purificación en bruto mediante ultracentrifugación, el intercambio de solución amortiguadora mediante filtración de flujo tangencial, o la formulación y filtración para preparar el vector a granel. Se utiliza una purificación de cromatografía por afinidad seguido de cromatografía en resina de intercambio de aniones para purificar el producto

farmacológico del vector y para eliminar cápsides vacías. Estos métodos se describen en más detalle en W02017/160360, seguido del 9 diciembre de 2016, titulada “Scalable Purification Method for AAV9”, que se incorpora mediante referencia. Los métodos de purificación para AAV8, W02017/100676, presentada el 9 de diciembre de 2016, y rh10, W02017/100704, presentada el 9 de diciembre de 2016, titulada “Scalable Purification Method for AAVrh10”, también presentada el 11 de diciembre de 2015, y para AAV1, W02017/100674, presentada el 9 de diciembre de 2016 para “Scalable Purification Method for AAV1”, presentada el 11 de diciembre de 2015, se incorporan por referencia en su totalidad a la presente. Pueden seleccionarse otros métodos adecuados.

[0114] Para calcular el contenido de las partículas completas y vacías, se grafican volúmenes de bandas VP3 para una muestra seleccionada (por ejemplo, en ejemplos en la presente una preparación purificada con un gradiente de iodixanol donde la cantidad de copias del genoma (GC) = la cantidad de partículas) con respecto a las partículas de GC cargadas. La ecuación lineal resultante ($y = mx + c$) se usa para calcular la cantidad de partículas en los volúmenes de bandas de los picos del artículo de ensayo. Luego, la cantidad de partículas (pt) cada 20 μL cargados se multiplica por 50 para proporcionar las partículas (pt)/mL. Las pt/mL divididas entre GC/mL proporciona la relación de partículas con respecto a copias genómicas (pt/GC). Pt/mL-GC/mL proporciona pt/mL vacías. Las pt vacías/mL divididas entre las pt/mL y $\times 100$ proporcionan el porcentaje de partículas vacías.

[0115] En términos generales, se conocen en la técnica los métodos para analizar cápsides vacías y partículas vectoriales de AAV con genomas incluidos. Véase, por ejemplo, Grimm et al., *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer et al., *Molec. Ther.* (2003) 7:122-128. Con el fin de evaluar la existencia de cápsides desnaturalizadas, los métodos incluyen someter la solución madre de AAV tratada a una electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, que consiste en cualquier gel con la capacidad de separar las tres proteínas de cápsides, por ejemplo, un gel de gradiente que contiene Tris-acetato al 3-8 % en la solución amortiguadora, luego migrar el gel hasta que el material

de la muestra se separe y transferir el gel a nailon o membranas de nitrocelulosa, preferentemente nailon. Luego, se usan anticuerpos de cápsides anti-AAV como los anticuerpos primarios que se unen con proteínas de cápsides desnaturalizadas, preferentemente un anticuerpo monoclonal de cápside anti-AAV, más preferentemente el anticuerpo monoclonal anti-AAV-2 B1 (Wobus et al., J. Virol. (2000) 74:9281- 9293). Luego se usa un anticuerpo secundario que se une al anticuerpo primario y contiene un medio para detectar la unión con el anticuerpo primario, más preferentemente, un anticuerpo anti-IgG que contiene una molécula de detección unida de manera covalente a este, más preferentemente, un anticuerpo de oveja anti-IgG de ratón unido de manera covalente a peroxidasa del rábano picante. Se usa un método para detectar la unión para determinar de manera semicuantitativa la unión entre los anticuerpos primarios y secundarios, preferentemente un método de detección con la capacidad de detectar emisiones de isótopos radiactivos, radiación electromagnética o cambios colorimétricos, más preferentemente un kit de detección de quimioluminiscencia. Por ejemplo, para la SDS-PAGE, se pueden obtener muestras de fracciones de columnas y calentar en solución amortiguadora de carga de SDS-PAGE que contenga un agente reductor (por ejemplo, DTT) y se resolvieron proteínas de cápsides en geles de poliacrilamida de gradiente premoldeados (por ejemplo, Novex). Se puede llevar a cabo una tinción argéntica con SilverXpress (Invitrogen, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante u otro método de tinción adecuado, es decir, los colorantes SYPRO Ruby o azul de coomassie. En una modalidad, la concentración de los genomas vectoriales (vg) de AAV en fracciones de columnas puede medirse a través de PCR cuantitativa (Q-PCR) en tiempo real. Las muestras se diluyen y se digieren con DNasa I (u otra nucleasa adecuada) para extraer el ADN exógeno. Después de la inactivación de la nucleasa, las muestras se diluyen y amplifican de manera adicional mediante el uso de cebadores y una sonda fluorogénica TaqMan™ específica para la secuencia de ADN entre los cebadores. Se mide la cantidad de ciclos necesarios para llegar a un nivel definido de fluorescencia (ciclo umbral, Ct) para cada muestra en un sistema de detección de secuencias Applied Biosystems Prism 7700. Se emplea ADN de plásmido que contiene secuencias idénticas a las contenidas en el vector AAV para

generar una curva estándar en la reacción Q-PCR. Los valores del ciclo umbral (Ct) obtenidos a partir de las muestras se usan para determinar la titulación del genoma del vector mediante su normalización hasta el valor Ct de la curva estándar plasmídica. También se pueden usar ensayos con criterios de valoración basados en la PCR digital.

[0106] En un aspecto, en la presente se proporciona un método de q-PCR optimizada que utiliza una proteasa de serina de espectro amplio, por ejemplo, una endopeptidasa K (tal como la que se encuentra disponible a nivel comercial a través de Qiagen). Más particularmente, el ensayo de título del genoma de qPCR optimizado es similar a un ensayo estándar, excepto que, después de la digestión con DNasa I, las muestras se diluyen con amortiguador de proteinasa K y se tratan con proteinasa K, y luego inactivación por calor. De manera adecuada, las muestras se diluyen con solución amortiguadora de proteinasa K en una cantidad igual al tamaño de la muestra. El amortiguador de proteinasa K puede concentrarse 2 veces o más. Típicamente, el tratamiento con la proteinasa K es de alrededor de 0,2 mg/mL, pero puede variar de 0,1 mg/mL a alrededor de 1 mg/mL. Por lo general, la etapa de tratamiento se lleva a cabo a alrededor de 55 °C durante alrededor de 15 minutos, pero puede llevarse a cabo a una temperatura más baja (por ejemplo, de alrededor de 37 °C a alrededor de 50 °C) durante un período de tiempo más largo (por ejemplo, de alrededor de 20 minutos a alrededor de 30 minutos), o a una temperatura más alta (por ejemplo, hasta alrededor de 60 °C) durante un período de tiempo más corto (por ejemplo, de alrededor de 5 a 10 minutos). De manera similar, la inactivación por calor tiene lugar por lo general a alrededor de 95 °C durante alrededor de 15 minutos, pero la temperatura puede disminuirse (por ejemplo, de alrededor de 70 a alrededor de 90 °C) y el tiempo extenderse (por ejemplo, de alrededor de 20 minutos a alrededor de 30 minutos). Las muestras se diluyen luego (por ejemplo, 1000 veces) y se someten a análisis TaqMan como se describe en el ensayo estándar.

[0107] De manera adicional o alternativa, puede utilizarse una PCR digital de goteo (ddPCR). Por ejemplo, se han descrito métodos para determinar titulaciones del

genoma vectorial de AAV de cadena simple y con autocomplementariedad mediante ddPCR. Ver, por ejemplo, M. Lock et al., *Hum Gene Therapy Methods*, Hum Gene Ther Methods. abr de 2014;25(2): 115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 14 de feb de 2014.

[0108] En determinadas modalidades, el proceso de fabricación para rAAV como se describe en la presente implica el método como se describe en la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 63/371,597, presentada el 16 de agosto de 2022, y la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 63/371,592, presentada el 16 de agosto de 2022, que se incorpora a la presente mediante referencia en su totalidad.

[0109] En resumen, el método para separar las partículas de rAAVhu68 (o AAVhu95 o AAVhu96) que tienen secuencias genómicas empaquetadas a partir de intermedios de rAAVhu68 (o AAVhu95 o AAVhu96) con deficiencia de genoma implica someter una suspensión que comprende partículas virales AAVhu68 (o AVhu95 o AAVhu96) recombinantes e intermedios de cápside de AAVhu68 (o AVhu95 o AAVhu96) a cromatografía líquida de rendimiento rápido, donde las partículas virales de AAVhu68 (o AVhu95 o AAVhu96) y los intermedios de AAVhu68 (o AVhu95 o AAVhu96) se unen a una resina de intercambio de aniones fuerte equilibrada a un pH de alrededor de 10,2 y sometida a un gradiente de sal mientras que se monitorea el eluato para determinar la absorbancia ultravioleta a alrededor de 260 nanómetros (nm) y alrededor de 280 nm. Si bien es menos óptimo para el rAAVhu68 (o rAAVhu95 o el AAVhu96), el pH puede estar en el intervalo de alrededor de 10 a 10,4. En este método, las cápsides completas de AAV se recolectan de una fracción que se eluye cuando la relación A260/A280 alcanza un punto de inflexión. En un ejemplo, para la etapa de cromatografía de afinidad, el producto diafiltrado puede aplicarse a una resina de afinidad (Life Technologies) que captura de forma eficaz el serotipo de AAV. En estas condiciones iónicas, un porcentaje significativo del ADN celular residual y proteínas fluye a través de la columna, mientras que las partículas de AAV se capturan de manera eficaz.

[0110] La rAAV.hLámina A (por ejemplo, rAAV.CMVe.chTNTp.Lámina.RBG) en una

composición compatible fisiológicamente adecuada (por ejemplo, una solución salina amortiguada). Esta composición puede ser congelada para su almacenamiento, descongelada posteriormente y opcionalmente diluida con un diluyente adecuado. Alternativamente, el vector puede prepararse como una composición adecuada para ser administrada a un paciente sin proceder a los pasos de congelación y descongelación.

[0111] Tal como se usa en la presente, la expresión «valor de NAb» hace referencia a una medición de cuánto anticuerpo neutralizante (por ejemplo, Nab anti-AAV) se produce para que se neutralice el efecto fisiológico de su epítipo seleccionado como diana (por ejemplo, un AAV). Los valores de NAb anti-AAV pueden determinarse tal como se describe, por ejemplo, en Calcedo, R., et al., *Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses*. *Journal of Infectious Diseases*, 2009. 199(3): p. 381-390, que se incorpora a la presente mediante referencia.

[0112] La abreviatura «sc» hace referencia a la autocomplementariedad. «AAV autocomplementario» hace referencia a una construcción en la cual se ha diseñado una región codificante en una secuencia de ácido nucleico de AAV recombinante para que forme una plantilla de ADN bicatenario intramolecular. Luego de la infección, en lugar de esperar la síntesis mediada por células de la segunda cadena, las dos mitades complementarias de AAVmc se asociarán para formar una unidad de ADN bicatenario (ADNbc) hasta que esté listo para la replicación y transcripción inmediatas. Ver, por ejemplo, D M McCarty et al., “Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis”, *Gene Therapy* (agosto 2001), Vol 8, Número 16, Páginas 1248-1254. Se describen AAV autocomplementarios, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.º 6.596.535, 7.125.717 y 7.456.683, cada una de las cuales se incorpora a la presente en su totalidad mediante esta referencia.

[0113] Un vector viral o virus «incapaz de replicarse» se refiere a una partícula viral sintética o artificial en la cual un casete de expresión que contiene un gen de interés está empaquetado en una cápside o envoltura viral, donde cualquier secuencia

genómica viral empaquetada también dentro de la cápside o envoltura viral es incapaz de replicarse; es decir, no puede generar viriones de progenie, pero retiene la capacidad de infectar células objetivo. En una modalidad, el genoma del vector vírico no incluye genes que codifiquen las enzimas cuya replicación se requiera (el genoma puede modificarse genéticamente para ser «sin agallas» y contener solamente el transgén de interés flanqueado por las señales requeridas para la amplificación y empaquetamiento del genoma artificial), pero estos genes pueden administrarse durante la producción. Por lo tanto, se considera seguro para su uso en la terapia génica, ya que los viriones descendientes no pueden replicarse e infectar, salvo en presencia de la enzima vírica que se necesita para la replicación.

[0114] Tal como se usa en la presente, los términos «rAAV» y «AAV artificial» que se usan de manera intercambiable, significan, de modo no taxativo, un AAV que comprende una proteína de cápside y un genoma de vector envuelto allí, donde el genoma de vector que comprende un ácido nucleico heterólogo al AAV. En una modalidad, la proteína de cápside es una cápside que no es de origen natural. Dicha cápside artificial puede generarse mediante cualquier técnica adecuada, utilizando una secuencia de AAV seleccionada (por ejemplo, un fragmento de una proteína de la cápside vp1) en combinación con secuencias heterólogas que pueden obtenerse de un AAV seleccionado diferente, porciones no contiguas del mismo AAV, de una fuente viral no AAV o de una fuente no viral. De modo no taxativo, un AAV artificial puede ser un AAV pseudotipado, una cápside de AAV quimérico, una cápside de AAV recombinante o una cápside de AAV «humanizado». Son útiles en la invención los vectores pseudotipados, en los cuales se reemplaza un AAV con una proteína de cápside heteróloga. En una modalidad, AAV2/5 y AAV2/8 son ejemplos de vectores pseudotipados. El elemento genético seleccionado se puede administrar utilizando cualquier método adecuado, incluidos transfección, electroporación, administración de liposomas, técnicas de fusión de membrana, gránulos recubiertos con ADN a gran velocidad, infección viral y fusión de protoplastos. Los expertos en manipulación de ácidos nucleicos conocen métodos que se utilizan para producir dichas construcciones, incluidas modificación genética, modificación recombinante y técnicas

de síntesis. Ver, por ejemplo, Green y Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012).

[0115] En muchos casos, las partículas de rAAV se denominan «resistentes a desoxirribonucleasa». Sin embargo, además de esta endonucleasa (desoxirribonucleasa), también pueden utilizarse otras endonucleasas y exonucleasas en las etapas de purificación, que se describen en la presente, para retirar los ácidos nucleicos contaminantes. Tales nucleasas pueden seleccionarse para degradar ADN monocatenario o ADN bicatenario y ARN. Tales etapas pueden contener una única nucleasa o mezclas de nucleasas, que se dirigen a diferentes objetivos y que pueden ser endonucleasas o exonucleasas.

[0116] La expresión «resistente a nucleasas» indica que la cápside de AAV se ensambló por completo alrededor del casete de expresión, el cual se diseña para administrar un gen a una célula hospedadora y protege dichas secuencias genómicas empaquetadas de la degradación (digestión) durante las etapas de incubación de nucleasa, diseñadas para remover ácidos nucleicos contaminantes que se puedan encontrar presentes en el proceso de producción.

[0117] Tal como se usa en la presente, una «subpoblación» de proteínas vp hace referencia a un grupo de proteínas vp que tiene al menos una característica definida en común y que consiste en al menos un miembro de grupo y hasta menos de todos los miembros del grupo de referencia, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, una «subpoblación» de proteínas vp1 es al menos 1 (una) proteína vp1 y menos de todas las proteínas vp1 en una cápside de AAV ensamblada, a menos que se indique otra cosa. Una «subpoblación» de proteínas vp3 puede ser al menos 1 (una) proteína vp3 y menos de todas las proteínas vp3 en una cápside de AAV ensamblada, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo, las proteínas vp1 pueden ser una subpoblación de proteínas vp, las proteínas vp2 pueden ser una subpoblación independiente de proteínas vp y vp3 son otra subpoblación de proteínas vp en una cápside de AAV ensamblada. En otro ejemplo, las proteínas vp1, vp2 y vp3 pueden contener subpoblaciones con modificaciones diferentes, por ejemplo, al menos una,

dos, tres o cuatro asparaginas muy desamidadas, por ejemplo, en pares asparagina-glicina.

Composición farmacéutica

[0118] En un aspecto, en la presente se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector como se describe en la presente en un amortiguador de formulación. En una modalidad, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un rAAV como se describe en la presente en un amortiguador de formulación. En una modalidad, el rAAV se formula a alrededor de 1×10^9 copias de genomas (GC)/mL a alrededor de 1×10^{14} GC/mL. En una modalidad adicional, el rAAV se formula a alrededor de 3×10^9 GC/mL a alrededor de 3×10^{13} GC/mL. En aún otra modalidad adicional, el rAAV se formula a alrededor de 1×10^9 GC/mL a alrededor de 1×10^{13} GC/mL. En una modalidad, el rAAV se formula al menos alrededor de 1×10^{11} GC/mL.

[0119] También se proporciona en la presente una composición que comprende un rAAV o un vector como el descrito en la presente y un medio de suspensión acuoso. En determinadas modalidades, la suspensión está formulada para su administración intravenosa, intratecal o intracerebroventricular. En un aspecto, las composiciones contienen al menos una solución madre de rAAV y un portador, excipiente y/o conservante opcional.

[0120] Tal como se utiliza en la presente, una «cepa» de rAAV se refiere a una población de rAAV. A pesar de la heterogeneidad de sus proteínas de la cápside debido a la desamidación, se espera que los rAAV de una cepa compartan un genoma vectorial idéntico. Una cepa puede incluir rAAV que tengan cápsides con, por ejemplo, patrones de desamidación heterogéneos característicos de las proteínas de la cápside del AAV seleccionadas y un sistema de producción seleccionado. La cepa puede producirse a partir de un único sistema de producción o agruparse a partir de múltiples ejecuciones del sistema de producción. Puede seleccionarse una variedad de sistemas de producción, incluyendo, entre otros, a los descritos en la presente.

[0121] Tal como se usa en la presente, "portador" incluye todos los solventes, medios de dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antifúngicos y antibacteriales, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, amortiguadores, soluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. El uso de tales medios y agentes para las sustancias activas farmacéuticas es conocido en la técnica. También se pueden incorporar en las composiciones ingredientes activos suplementarios. La expresión «farmacéuticamente aceptable» se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un hospedador. Los vehículos de administración tales como liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares, se pueden utilizar para la introducción de las composiciones de la presente invención en células hospedadoras adecuadas. En particular, los genomas de vector administrados por el vector de rAAV se pueden formular para su administración encapsulados en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera o una nanopartícula, o similares.

[0122] En una modalidad, una composición incluye una formulación final adecuada para su administración a un sujeto, por ejemplo, es una suspensión líquida acuosa amortiguada con un pH y una concentración de sal compatibles desde el punto de vista fisiológico. Opcionalmente, se encuentran presentes uno o más tensioactivos en la formulación. En otra modalidad, la composición puede transportarse como concentrado, que se diluye para su administración a un sujeto. En otras modalidades, la composición puede estar liofilizada y reconstituirse al momento de la administración.

[0123] Es posible seleccionar un tensioactivo adecuado, o combinación de tensioactivos, de entre tensioactivos no iónicos que no son tóxicos. En una modalidad, se selecciona un tensioactivo copolímero de bloques difuncional que termina en grupos hidroxilo primarios, por ejemplo, tal como Pluronic® F68[BASF], también conocido como Poloxámero 188, que tiene un pH neutro, tiene un peso molecular promedio de 8400. Es posible seleccionar otros tensioactivos y otros poloxámeros, es decir, copolímeros de tribloque no iónicos compuestos por una cadena hidrofóbica central de

polioxipropilen polipropilenóxido)) flanqueada por dos cadenas hidrofílicas de polioxietilen(poli(etilenóxido)), SOLUTOL HS 15 (hidroxiestearato de macrogol-15), LABRASOL (glicérido polioxi caprílico), oleil éter de polioxi 10, TWEEN (ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán), etanol y polietilenglicol. En una forma de realización, la formulación contiene un poloxámero. Estos copolímeros se nombran comúnmente con la letra «P» (por poloxámero) seguida por tres dígitos: los primeros dos dígitos x 100 proporcionan la masa molecular aproximada del núcleo de polioxipropileno y el último dígito x 10 proporciona el porcentaje de contenido de polioxietileno. En una modalidad, se selecciona el Poloxámero 188. En una modalidad, el tensioactivo puede estar presente en una cantidad de hasta alrededor del 0,0005 % a alrededor del 0,001 % (basado en la relación en peso, p/p) de la suspensión. En otra modalidad, el tensioactivo puede estar presente en una cantidad de hasta alrededor del 0,0005 % a alrededor del 0,001 % (basado en la relación en peso, p/p) de la suspensión. En aun otra modalidad, el tensioactivo puede estar presente en una cantidad de hasta alrededor del 0,0005 % a alrededor del 0,001 % de la suspensión, en donde n % indica n gramo por 100 mL de suspensión.

[0124] En otra modalidad, la composición incluye un portador, diluyente, excipiente o adyuvante. Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente portadores adecuados a la vista de la indicación para la cual se dirige el virus de transferencia. Por ejemplo, un portador adecuado incluye solución salina, la cual se puede formular con diversas soluciones amortiguadoras (por ejemplo, solución salina amortiguada con fosfato). Otros ejemplos de portadores incluyen solución salina estéril, lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, gelatina, dextrano, agar, pectina, aceite de cacahuete, aceite de sésamo y agua. El amortiguador/portador debe incluir un componente que evite que el rAAV se adhiera al tubo de infusión pero que no interfiera con la actividad de unión del rAAV in vivo. Es posible seleccionar un tensioactivo adecuado, o una combinación de tensioactivos, de entre los tensioactivos no iónicos que no son tóxicos. En una modalidad, se selecciona un tensioactivo de copolímero en bloque disfuncional que termina en grupos hidroxilos primarios, por ejemplo, como Poloxámero 188 (también conocido con los nombres comerciales Pluronic® F68 [BASF], Lutrol® F68,

Synperonic® F68, Kolliphor® P188) que tiene un pH neutro, tiene un peso molecular promedio de 8400. Es posible seleccionar otros tensioactivos y otros poloxámeros, es decir, copolímeros en tribloque no iónicos, compuestos por una cadena hidrófoba central de polioxipropileno (polipropilén óxido)) flanqueada por dos cadenas hidrófilas de polioxietileno (poli(óxido de etileno)), SOLUTOL HS 15 (Hidroxiestearato de macrogol-15), LABRASOL (Polioxi glicérido caprílico), éter de oleilo de polioxi, TWEEN (ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano), etanol y polietilenglicol. En una modalidad, la formulación contiene un poloxámero. Estos copolímeros se nombran comúnmente con la letra «P» (por poloxámero) seguida por tres dígitos: los primeros dos dígitos $\times 100$ proporcionan la masa molecular aproximada del núcleo de polioxipropileno y el último dígito $\times 10$ proporciona el porcentaje de contenido de polioxietileno. En una modalidad, se selecciona el Poloxámero 188. El tensioactivo puede encontrarse presente en una cantidad de hasta alrededor de 0,0005 % a alrededor de 0,001 % en peso de la suspensión.

[0125] En determinadas modalidades, la composición que contiene rAAV.hCDKL5 se administra a un pH en el intervalo de 6,8 a 8, o 7,2 a 7,8 o 7,5 a 8. En determinadas modalidades, la composición que contiene la rAAV.hLámina A se administra de forma intravenosa a un pH de alrededor de 6,5 a alrededor de 7,5 puede ser deseada. En determinadas modalidades, la composición que contiene la rAAV.hLámina A se administra de forma intravenosa a un pH de alrededor de 6,8 a alrededor de 7,2 puede ser deseada. Sin embargo, es posible seleccionar otros pH comprendidos en intervalos más amplios y dichos subintervalos se podrían seleccionar para otra vía de administración.

[0126] En determinadas modalidades, las formulaciones pueden contener una solución salina acuosa amortiguada que no comprende bicarbonato de sodio. Dicha formulación puede contener una solución salina acuosa amortiguada que comprende uno o más de fosfato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio y mezclas de estos en agua, tal como un amortiguador de Harvard. En una modalidad, la solución amortiguadora es PBS.

[0127] Opcionalmente, las composiciones de la invención pueden contener, además del rAAV y los portadores, otros ingredientes farmacéuticos convencionales, tales como conservantes o estabilizadores químicos. Los conservantes de ejemplo adecuados incluyen clorobutanol, sorbato de potasio, ácido sórbico, dióxido de azufre, galato de propilo, parabenos, etilvainillina, glicerina, fenol y paraclorofenol. Los estabilizadores químicos adecuados incluyen gelatina y albúmina.

[0128] Las composiciones según la presente invención pueden comprender un portador farmacéuticamente aceptable, tal como se definió anteriormente. De manera adecuada, las composiciones descritas en la presente comprenden una cantidad eficaz de uno o más AAV suspendidos en un portador farmacéuticamente adecuado y/o mezclados con excipientes adecuados diseñados para su administración al sujeto mediante inyección, o para administrarse mediante otra vía y/o dispositivo.

[0129] En una modalidad, una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho vector está incluida en la composición farmacéutica. La selección del portador no es una limitación de la presente invención. Como se utiliza en la presente, una «cantidad terapéuticamente eficaz» hace referencia a la cantidad de la composición que comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica hLámina A (o un rAAV o un vector de este) que administra y expresa en las células objetivo una cantidad de proteína suficiente para obtener la eficacia. En una modalidad, la dosificación del vector es alrededor de 1×10^9 GC/kg de masa a alrededor de 1×10^{14} GC/kg, inclusive todos los números enteros o cantidades fraccionadas dentro del intervalo y los extremos. La dosificación se ajusta para equilibrar el beneficio terapéutico contra cualquier efecto secundario y tales dosis pueden variar en función de la aplicación terapéutica para la cual se emplea el vector recombinante. Los niveles de expresión del producto transgénico pueden controlarse para determinar la frecuencia de la dosificación que produzca vectores virales, preferentemente vectores de AAV que contengan el minigén. Opcionalmente, es posible utilizar esquemas de dosificación similares a los descritos para fines terapéuticos para la inmunización con las composiciones de la invención.

[0130] La frase «farmacéuticamente aceptable» hace referencia a composiciones y entidades moleculares que no produzcan una reacción alérgica o reacción adversa similar cuando se administran a un hospedador.

[0131] Tal como se usa en la presente, el término «dosificación» o «cantidad» puede hacer referencia a la cantidad o dosificación total que se le suministra al sujeto durante el transcurso del tratamiento o la dosificación o cantidad que se le suministra en una sola administración unitaria (o dosificación de unidades múltiples o separadas).

[0132] Asimismo, las composiciones de virus incapaz de replicarse se pueden formular en unidades de dosis que contengan una cantidad de virus incapaz de replicarse en el intervalo de alrededor de $1,0 \times 10^9$ GC a alrededor de $1,0 \times 10^{16}$ GC (para tratar a un sujeto promedio de 70 kg de peso corporal), lo cual incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del intervalo y, preferentemente, de $1,0 \times 10^{12}$ GC a $1,0 \times 10^{14}$ GC para un paciente humano. En una modalidad, las composiciones se formulan de forma que contengan al menos 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 o 9×10^9 GC por dosis, lo que incluye todas las cantidades enteras o fraccionadas comprendidas dentro del intervalo. En otra modalidad, las composiciones se formulan con al menos 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} o 9×10^{10} GC por dosis, lo cual incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del intervalo.

[0148] En otra modalidad, las composiciones se formulan de forma que contengan al menos 1×10^{11} , 2×10^n , 3×10^n , 4×10^n , 5×10^n , 6×10^n , 7×10^n , 8×10^n o 9×10^n GC por dosis, lo que incluye todas las cantidades enteras o fraccionadas comprendidas dentro del intervalo. En otra modalidad, las composiciones se formulan con al menos 1×12^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} o 9×10^{10} GC por dosis, lo cual incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del intervalo. En otra modalidad, las composiciones se formulan con al menos 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} , o 9×10^{13} GC por dosis, lo cual incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del intervalo. En otra modalidad, las composiciones se formulan con al menos 1×14^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} ,

6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} o 9×10^{10} GC por dosis, lo cual incluye todas las cantidades en números enteros o fracciones dentro del intervalo. En otra modalidad, las composiciones se formulan de forma que contengan al menos 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} o 9×10^{15} GC por dosis, lo que incluye todas las cantidades enteras o fraccionadas comprendidas dentro del intervalo. En una modalidad, para la aplicación humana, la dosis puede variar entre 1×10^{10} y alrededor de 1×10^{12} GC por dosis, incluidos todos los números enteros o fraccionarios dentro del intervalo.

[0133] Se debe entender que las composiciones en la composición farmacéutica descrita en la presente pretenden ser aplicadas a otras composiciones, regímenes, aspectos, modalidades y métodos descritos a lo largo de la memoria descriptiva.

Métodos y usos

[0134] En un aspecto, se proporciona un método en la presente para tratar a un sujeto humano diagnosticado con cardiomiopatía dilatada idiopática (DCM) o una enfermedad relacionada con una mutación en el gen LMNA. Se proporciona adicionalmente en la presente el uso de un rAAV en la fabricación (preparación) de un medicamento para el tratamiento de un sujeto humano diagnosticado con cardiomiopatía dilatada idiopática (DCM) o una enfermedad relacionada con una mutación en el gen LMNA.

[0135] El método comprende administrarle a un sujeto una suspensión de un vector o un rAAV como se describe en la presente. En una modalidad, el método comprende administrarle a un sujeto una suspensión de un rAAV como se describe en la presente en un amortiguador de formulación a una dosis de alrededor de 1×10^9 de copias del genoma (GC)/kg a alrededor de 1×10^{14} GC/kg. En una modalidad adicional, se formula el rAAV a 3×10^{13} GC/kg.

[0136] En determinadas modalidades, el método de tratamiento de DCM idiopática o una enfermedad relacionada con una mutación en el gen LMNA comprende

adicionalmente el monitoreo de la expresión de hLáminaA y el porcentaje de transducción de cardiomiocitos con el uso de una biopsia endomiocárdica.

[0137] Los métodos y composiciones descritos en la presente pueden usarse para el tratamiento de cualquiera de las etapas de cardiomiopatía dilatada idiopática (DCM) o una enfermedad relacionada con una mutación en un gen de Lámina A (LMNA). En determinadas modalidades, el paciente es un lactante, un niño pequeño, o el paciente tiene de 3 a 6 años, de 3 a 12 años, de 3 a 18 años, de 3 a 20 años. En ciertas modalidades, los pacientes son mayores de 18 años. En ciertas modalidades, el paciente tiene alrededor de 20 a 60. En determinadas modalidades, el paciente tiene alrededor de 40 a 50. En determinadas modalidades, los pacientes son mayores de 60 años.

[0138] En determinadas modalidades, los métodos y composiciones pueden usarse para el tratamiento de una forma de origen adulto de cardiomiopatía dilatada con defectos de conducción. En determinadas modalidades, los métodos y las composiciones pueden usarse para el tratamiento de la cardiopatía de LMNA causada por la mutación de pérdida de función en el gen LMNA. En determinadas modalidades, los métodos y composiciones pueden usarse para el tratamiento de la cardiomiopatía LMNA que es de herencia dominante autosómica. En determinadas modalidades, los métodos y composiciones pueden usarse para el tratamiento de la enfermedad de fenotípica de inicio temprano (por ejemplo, DCM idiopático) relacionado con mutaciones sin sentido en el gen LMNA. En determinadas modalidades, los métodos y las composiciones pueden usarse para el tratamiento de la cardiomiopatía LMNA (por ejemplo, DCM idiopática) relacionada con el cambio de sentido y el truncamiento en el gen de LMNA. En determinadas modalidades, los métodos y las composiciones pueden usarse para el tratamiento de una cardiomiopatía LMNA (por ejemplo, DCM idiopática) relacionada con mutación Q15X en el gen LMNA. En determinadas modalidades, los métodos y las composiciones pueden usarse para el tratamiento de una cardiomiopatía LMNA (por ejemplo, DCM idiopática) relacionada con mutación N195K en el gen LMNA.

[0139] Adicionalmente, pueden relacionarse otras enfermedades con una mutación en un gen LMNA inclusive distrofia muscular, neuropatía, lipodistrofia, progeroide segmental. Por ejemplo, las enfermedades relacionadas con una mutación en un gen LMNA incluyen distrofia muscular de Emery-Dreifuss (EDMD), síndrome de Malouf (MLF), distrofia muscular congénita (MDC), distrofia muscular de Limb-Gardle tipo 1B (LGMD1B), enfermedad de Charcot-Marie-Tooth tipo 2B1 (CMT2B1), neuropatía axonal, lipodistrofia parcial familiar tipo 2 (FPLD2), lipodistrofia con displasia mandibuloacral (MAD), displasia mandibuloacral tipo A (MADA), síndrome de Werner atípico (AWS), síndrome de envejecimiento prematuro (progeria) y síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS).

[0140] Los síntomas de cardiomiopatía dilatada idiopática (DCM) o una enfermedad relacionada con una mutación en un gen Lámina A (LMNA) incluye bloqueo de la conducción atrioventricular (AV), fibrilación atrial, arritmia atrial, inclusive aleteo atrial y taquicardia atrial, arritmias ventriculares inclusive taquicardias ventriculares sostenidas y fibrilación ventricular (VF). En determinadas modalidades, los métodos y composiciones descritos en la presente se utilizan para aliviar o mejorar uno o más de los síntomas de la cardiomiopatía dilatada idiopática (DCM) o una enfermedad relacionada con una mutación en un gen Lámina A (LMNA) inclusive un bloqueo de la conducción atrioventricular (AV), fibrilación atrial, taquicardia, arritmias ventriculares que incluyen taquicardias ventriculares sostenidas y cardiopatía dilatada con fibrilación ventricular (VF) y/o falla cardíaca. En determinadas modalidades, los métodos y composiciones descritos en la presente pueden usarse para aliviar uno o más síntomas de una cardiopatía dilatada idiopática (DCM) o una enfermedad relacionada con una mutación en un gen Lámina A (LMNA) inclusive un aumento en la vida promedio y/o una reducción en la evolución hacia la falla cardíaca.

[0141] En determinadas modalidades, pueden utilizarse coterapias o cotratamientos, que comprenden la coadministración con otro agente activo. En determinadas modalidades, la coterapia puede comprender adicionalmente la administración de betabloqueadores, inhibidores de enzimas convertidora de angiotensina (ACE),

diuréticos. Un agente diurético utilizado puede ser la acetazolamina (Diamox) u otros diuréticos adecuados. En algunas modalidades, el agente diurético se administra en el momento de la administración de la terapia génica. En algunas modalidades, el agente diurético se administra antes de la administración de la terapia génica. En algunas modalidades, el agente diurético se administra cuando el volumen de inyección es de 3 ml. En determinadas modalidades, el cotratamiento puede comprender adicionalmente desfibriladores cardioversores implantables (ICD), marcapasos (PM) y/o terapia de resincronización cardíaca (CRT)

[0142] Opcionalmente, es posible usar una terapia conjunta inmunosupresora. Los inmunosupresores para tal cotratamiento incluyen, entre otros, un glucocorticoide, esteroides, antimetabolitos, inhibidores de linfocitos T, un macrólido (por ejemplo, rapamicina o rapálogo) y agentes citostáticos que incluyen un agente alquilante, un antimetabolito, un antibiótico citotóxico, un anticuerpo o un agente que actúa sobre la inmunofilina. El supresor inmunitario puede incluir una mostaza nitrogenada, nitrosourea, compuesto de platino, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, fluorouracilo, dactinomicina, una antraciclina, mitomicina C, bleomicina, mitramicina, anticuerpos dirigidos al receptor IL-2 (CD25) o CD3, anticuerpos anti-IL-2, ciclosporina, tacrolimus, sirolimus, IFN- β , IFN- γ , un opioide, o un agente de unión a TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). En determinadas modalidades, la terapia inmunosupresora puede iniciarse 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o más días antes de o después de la administración de la terapia génica. Dicha terapia inmunosupresora puede implicar la administración de uno, dos o más fármacos (por ejemplo, glucocorticoides, prednelisona, mofetil micofenolato (MMF) y/o sirolimus (es decir, rapamicina)). Dichos fármacos inmunosupresores se pueden administrar a un sujeto que los necesita una vez, dos veces o más veces en la misma dosis o una dosis ajustada. Dicho tratamiento puede implicar la coadministración de dos o más fármacos, el (por ejemplo, prednelisona, micofenolato de mofetilo (MMF) y/o sirolimus (es decir, rapamicina)) el mismo día. Es posible continuar con uno o más de estos fármacos luego de la administración de la terapia génica, en la misma dosis o una dosis ajustada. Dicha terapia puede ser durante alrededor de 1 semana (7 días), alrededor de 60 días o más, según sea

necesario. En determinadas modalidades, se selecciona un régimen libre de tacrolimus.

[0143] En una modalidad, el rAAV como se describe en la presente se administra una vez al sujeto que lo necesita. En otra modalidad, el rAAV se administra más de una vez al sujeto que lo necesita.

[0144] «Paciente» o «sujeto», tal como se usa en la presente, significa indistintamente un animal mamífero macho o hembra, inclusive un ser humano, un animal veterinario o de granja, un animal doméstico o mascota, y animales utilizados normalmente para la investigación clínica. En una modalidad, el sujeto de los métodos y las composiciones de la presente es un paciente humano. En una modalidad, el sujeto de estos métodos y composiciones es un paciente humano masculino o femenino. En determinadas modalidades, el sujeto de estos métodos y composiciones es diagnosticado con una cardiomiopatía dilatada idiopática (DCM) o una enfermedad relacionada con una mutación en un gen Lámina A (LMNA) y/o con síntomas de una cardiomiopatía dilatada idiopática (DCM) o una enfermedad relacionada con una mutación en un gen Lámina A (LMNA).

[0145] Se debe entender que las composiciones en los métodos descrito en la presente pretenden ser aplicadas a otras composiciones, regímenes, aspectos, modalidades y métodos descritos a lo largo de la memoria descriptiva.

Kit

[0146] En determinadas modalidades, se proporciona un kit que incluye un vector concentrado suspendido en una formulación (opcionalmente congelada), un amortiguador de dilución opcional y dispositivos y componentes necesarios para la administración intravenosa. En otra modalidad, el kit puede incluir, de forma adicional o alternativa, componentes para la administración intravenosa. En una modalidad, el kit proporciona suficiente amortiguador para permitir la inyección. Dicho amortiguador puede permitir una dilución de alrededor de 1:1 a 1:5 de un vector concentrado, o más.

En otras modalidades, las cantidades superiores o inferiores de un amortiguador o agua estéril se incluyen para permitir la titulación de la dosis y otros ajustes por parte del médico tratante. En aun otras modalidades, se incluyen uno o más componentes del dispositivo en el kit. El amortiguador de dilución adecuado se encuentra disponible, tal como, una solución salina, una solución salina amortiguada con fosfato (PBS) o un glicerol/PBS.

[0146] Debe entenderse que las composiciones en el kit descritas en la presente pretenden aplicarse a otras composiciones, regímenes, aspectos, modalidades y métodos descritos a lo largo de la memoria descriptiva.

[0147] El término «heterólogo», como se usa en la presente para describir una secuencia de ácidos nucleicos o una proteína significa que el ácido nucleico o la proteína se derivaron de un organismo diferente o de una especie diferente del mismo organismo con respecto a la célula hospedadora o al sujeto en el cual están expresados. Cuando se utiliza en relación con una proteína o un ácido nucleico en un plásmido, casete de expresión o vector, el término «heterólogo» indica que la proteína o el ácido nucleico se encuentran presentes con otra secuencia o subsecuencia con la cual la proteína o el ácido nucleico en cuestión no se encuentran en la misma relación en la naturaleza.

[0148] Tal como se describe anteriormente, los términos «aumentar», «disminuir», «reducir», «mejorar», «retrasar», o cualquier variación gramatical de estos, o cualquier término similar que indique un cambio, significan una variación de alrededor de 5 veces, alrededor de 2 veces, alrededor de 1 vez, alrededor del 90 %, alrededor del 80 %, alrededor del 70 %, alrededor del 60 %, alrededor del 50 %, alrededor del 40 %, alrededor del 30 %, alrededor del 20 %, alrededor del 10 %, o alrededor del 5 % en comparación con la referencia correspondiente (por ejemplo, control no tratado o un sujeto en condiciones normales sin LMNA), a menos que se especifique lo contrario.

[0149] El término «expresión» se usa en la presente en su sentido más amplio y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína. Con respecto al ARN, el

término «expresión» o «traducción» se refiere en particular a la producción de péptidos o proteínas. La expresión puede ser transitoria o estable.

[0150] Como se utiliza en la presente, el término «administración» o cualquier variación gramatical de este hace referencia a la administración de la composición descrita en la presente a un sujeto.

[0151] Las expresiones «comprender», «comprende/n» y «que comprende/n» deben interpretarse de manera inclusiva y no exclusiva. Las expresiones «consistir», «que consiste/n» y sus variantes se deben interpretar de manera exclusiva y no inclusiva. Si bien se presentan diversas modalidades en la memoria descriptiva con el uso de la expresión «que comprende», en otras circunstancias, también se pretende que una modalidad relacionada sea incluida y se describa con el uso de la expresión «que consiste en» o «que consiste esencialmente en». Tal como se utiliza a lo largo de la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, las expresiones «que comprende», «que contiene», «que incluye» y sus variantes incluyen otros componentes, elementos, números enteros, etapas y similares. Por el contrario, la expresión «que consiste» y sus variantes excluyen otros componentes, elementos, números enteros, etapas y similares.

[0152] Debe observarse que el término «un» o «una» hace referencia a uno o más. Como tales, los términos «un» (o «una»), «uno o más» y «al menos uno» se utilizan de forma intercambiable en estos.

[0153] Como se utiliza en la presente, el término «alrededor de» o «~» hace referencia a una variante de $\pm 10\%$ a partir de los números enteros de referencia y valores entre estos, a menos que se especifique lo contrario. Por ejemplo «alrededor de» 500 pM incluye ± 50 (es decir, 450 - 550, que incluye los números enteros entre estos). Para otros valores, particularmente cuando la referencia es a un porcentaje (por ejemplo, un 90 % de gusto), el término «alrededor de» es inclusivo para todos los valores dentro del intervalo inclusive los números enteros y las fracciones.

[0154] Como se describe anteriormente, el término «alrededor de» cuando se utiliza para modificar un valor numérico significa una variación de $\pm 10\%$, ($\pm 10\%$, por ejemplo, ± 1 , ± 2 , ± 3 , ± 4 , ± 5 , ± 6 , ± 7 , ± 8 , ± 9 , ± 10 o valores entre estos) a partir de la referencia dada, a menos que se especifique lo contrario.

[0155] En determinados casos, el término «E $\pm$ #» o el término «e $\pm$ #» se utiliza para hacer referencia a un exponente. Por ejemplo, «5E10» o «5e10» es 5×10^{10} . Estos términos pueden usarse de forma intercambiable.

[0156] Con respecto a la descripción de diversas modalidades en la presente, se pretende que cada una de las composiciones descritas en la presente sea útil, en otra modalidad, en los métodos de la invención. Además, también se pretende que cada una de las composiciones descritas en la presente como útiles en los métodos, sea, en otra modalidad, en sí misma una modalidad de la invención.

[0157] A menos que se defina lo contrario en la presente memoria descriptiva, los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que entienden normalmente las personas del oficio de nivel medio a la que esta invención pertenece y por referencia a textos publicados, lo que proporciona a una persona del oficio de nivel medio una guía general de muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

EJEMPLOS

[0158] Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar determinados aspectos de la invención reivindicada. La invención no se limita a estos ejemplos.

[0159] Existe una necesidad extremadamente alta e insatisfecha en la forma de inicio adulto de la cardiopatía dilatada (DCM) con defectos de conducción, donde se observa una capacidad de penetración completa con una tasa alta de trasplante y fallecimiento. En algunos casos, la DCM es causada por mutaciones con pérdida de función en el gen Lámina A (LMNA), que la hace susceptible a la terapia de sustitución. La DCM tiene un patrón de herencia dominante autosómica, por lo tanto, la presencia de la

proteína normal residual reduce el riesgo de respuesta inmunitaria al transgén administrado en los casos de la terapia de sustitución génica. Ya que existen aproximadamente 40 000 pacientes con cardiomiopatía (o DCM) relacionada con LMNA sintomáticos en Estados Unidos, existe una gran población de pacientes a la que abordar.

[0160] Son comunes las mutaciones con cambio de sentido y truncamientos en las familias de DCM. Las mutaciones sin sentido se observan en fenotipos más graves y/o de inicio temprano (Hasselberg et al. *European Heart Journal* (2018) 39, 853-860; Suguru Nishiuchi. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. Gene-Based Risk Stratification for Cardiac Disorders in LMNA Mutation Carriers, Volumen: 10, Número: 6). En algunos casos de DCM, en portadores de mutaciones con truncamientos muy tempranos del gen LMNA demuestra la falta de función negativa dominante (por ejemplo, Q15X). Existen modelos de ratón con inactivación de LMNA y mutaciones de LMNA disponibles para abordar la función de Lámina A. Por ejemplo, los ratones que tienen la mutación de DCM N195N tienen un fenotipo menos grave que los ratones KO.

[0161] En este caso, se desarrolló un vector de AAV que expresa Lámina A humana madura (hLámina A) a partir de un promotor selectivo cardíaco que rescata el fenotipo mortal de ratones con inactivación de LMNA.

EJEMPLO 1. Producción del rAAV que comprende Lámina A.

[0162] En los estudios de la presente, se generó una secuencia de LáminaA humana madura modificada (también designada como hLáminaA, hLámina A, huLáminaA, huLámina A, hLMNA) y un rAAV que comprende hLámina A madura y se llevaron a cabo los estudios comparativos. En algunos casos, se generaron rAAV que comprenden promotores especificados del gen GFP y se utilizaron para evaluar la expresión del transgén cardíaco activado por promotor en ratones.

[0163] Los rAAV se generaron con el uso técnicas de transfección triple, con el uso de (1) un plásmido cis que codifica proteínas rep de AAV2 y el gen cap de AAVhu68 VP1,

(2) un plásmido cis que comprende genes auxiliares de adenovirus no proporcionados por la línea celular de empaquetamiento que expresa adenovirus El a, y (3) un plásmido trans que contiene el genoma del vector para el empaquetamiento en la cápside de AAV. Ver, por ejemplo, US 2020/0056159. El plásmido trans se designa para contener el genoma del vector que comprende huLámina A.

[0164] El genoma del vector contiene una repetición terminal invertida (ITR) de AAV 5' y una ITR de AAV 3' en el extremo 5' y 3', respectivamente. Las ITR flanquean las secuencias del casete de expresión empaquetados en la cápside de AAV que tienen secuencias que codifican una Lámina A madura. El casete de expresión comprende adicionalmente secuencias reguladoras operativamente unidas a las secuencias codificantes de la proteína de fusión, cuya secuencia de control reguladora incluye un promotor cardíaco híbrido que comprende un potenciador IE CMV, una secuencia espaciadora y troponina T cardíaca de pollo (chTnT), donde el casete de expresión incluye adicionalmente una poli A de betaglobina de conejo (RBG). La SEQ ID NO: 1 hace referencia al casete de expresión de CMV- IE.chTnT.madura_hLáminaA.rBG. SEQ ID NO: 2 hace referencia al genoma del vector de rAAV.CMV- IE.chTnT.madura_hLáminaA.rBG, también designada más adelante como rAAV.hLáminaA.

[0165] Adicionalmente, se examinó la eficacia del uso de diversas cápsides de AAV para obtener una transducción de AAV específica cardíaca. Se examinaron la cápside AAVhu95 y la cápside AAVhu96. La cápside AAVhu95 y AAVhu96 son cápsides de AAV de subtipo F que se aisló de tejido humano. La cápside AAVhu95 y la cápside AAVhu96 se relacionan estrechamente con la cápside AAVhu68, y tiene rendimientos de producción similares. Adicionalmente, luego de la evaluación, la cápside AAVhu95 mostró una mejora moderada en la transducción cardíaca con respecto a la cápside AAVhu68. Brevemente, en este estudio, se le administró a un único NHP de forma intravenosa una combinación de 3 vectores (AAVhu68, AAVhu95, y AAVhu96), cada uno de los cuales expresa un código de barras único (3×10^{13} GC/vector). La FIG. 1A muestra los niveles relativos de transferencia génica a un corazón de NHP graficados

como cambios de múltiplo en las lecturas de la secuenciación de ARN (prevalencia de lecturas de ARN en el tejido con respecto a la concentración del vector administrada) con respecto a AAVhu68. De forma similar, se trataron ratones con 10^{12} GC del vector indicado (AAVhu95 o AAVhu68) que expresa GFP. Los animales se sacrificaron 14 días luego de la administración del vector y las copias de ARN del vector y se cuantificó el área positiva para fluorescencia GFP de las muestras de corazón. La FIG. 1B muestra los niveles de transducción en un corazón de ratón luego de la administración con AAVhu68 o AAVhu95 que comprende el gen que codifica la proteína fluorescente verde, graficados como el porcentaje de área positiva para GFP. La FIG. 1C muestra los niveles de transducción en un corazón de ratón luego de la administración con AAVhu68 o AAVhu95 que comprende el gen que codifica la proteína fluorescente verde, graficados como la cantidad de copias/ng de ARN.

EJEMPLO 2. Estudio piloto que examina la eficacia de rAAV que comprende Lámina A en un modelo de ratón con inactivación de Lámina A

[0166] En este estudio, se utilizó una cápside de AAVhu95 y una cápside de AAVhu68 (un estudio de ratón inicial), que codifica una Lámina A madura bajo control regulador de un promotor cardíaco híbrido que comprende un potenciador IE CMV, una secuencia espaciadora y un promotor selectivo cardíaco (Troponina T cardíaca o TnT). El uso de la secuencia modificada que codifica la Lámina A madura evita la toxicidad potencial de una prelamina famesilada no escindida. Adicionalmente, la parte famesilada de la Lámina A (no incluida en la Lámina A madura) parece ser innecesaria para la función. Adicionalmente, los ratones con Lámina C son normales desde el punto de vista fenotípico.

[0167] Brevemente, se inyectaron compañeros de camada con inactivación de Lámina A (KO) y recién nacidos de tipo salvaje (WT) (N-7-10 por grupo) de forma intravenosa (va inyección de la vena temporal) con un vehículo (PBS) o AAVhu68.huLáminaA a una dosis de 5×10^{10} GC (5e10 GC, alrededor de 3×10^{13} GC/kg (3e13 GC/kg)) en el día 0 posnacimiento (dosis aproximada asumiendo el peso de 1g 5e13 GC/kg). Se examinó la supervivencia de los ratones, y se midieron los pesos corporales a lo largo

del estudio, en los días indicados. Los parámetros de supervivencia y ecográficos cardíacos se registraron en una duración máxima de 12 semanas. El tratamiento muestra el rescate de supervivencia; los parámetros cardíacos claramente no mejoraron mediante eco (posiblemente varios defectos del modelo antes del tratamiento al momento del nacimiento). Se llevaron a cabo mediciones del intervalo doppler del tejido y de espectros in vivo junto con ecocardiografía transtorácica de Modo B y Modo M bidimensional en todos los ratones a P42 con el uso del sistema de imagenología con ultrasonido Vevo 3100 (FUJIFILM Visual Sonics) y un transductor 40 Mhz. Los ratones se anestesiaron con isoflurano al 2 % en una cámara de inducción durante 3 minutos, luego se movieron a una plataforma de monitoreo animal con capacidad de ECG y termorregulación controlada por retroalimentación a partir de un termómetro rectal. Allí, se les colocó a los ratones un cono nasal (isoflurano al 1,5 % para mantener el plano de anestesia). Se utilizó nair para eliminar el pelo antes de la toma de imágenes. Los investigadores que llevaron a cabo la adquisición de eco y los análisis fueron ciegos a los grupos de estudio. El análisis se llevó a cabo con el uso de un software Vevo LAB (FUJIFILM VisualSonics).

[0168] La FIG. 2A muestra una gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones con inactivación (KO) de Lámina y de tipo salvaje (WT) a los que se les administró en la etapa de recién nacidos un control de vehículo o AAVhu68.hLáminaA de forma intravenosa en una dosis de 5×10^{10} GC (aproximadamente 3×10^{13} GC/kg). La FIG. 2A muestra los pesos corporales de ratones con inactivación (KO) de Lámina y de tipo salvaje (WT) a los que se les administró en la etapa de recién nacidos un control de vehículo o AAVhu68.hLáminaA de forma intravenosa en una dosis de 5×10^{10} GC (aproximadamente 3×10^{13} GC/kg). La FIG. 2C muestra una transferencia western representativa que confirma la expresión de LáminaA en el corazón y una falta de expresión de LáminaA en el hígado luego de la administración de AAVhu68.hLáminaA en ratones inactivados. Estos resultados confirman la expresión de Lámina A en el tejido del corazón, y muestran un aumento de la supervivencia en ratones inactivados con el tratamiento AAV-LMNA. Luego de la necropsia, se recolectaron tejidos del hígado y del corazón y se analizaron con tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo

laminar antihumano para examinar la expresión de huLámina A madura (FIG. 3A-3C).

[0169] La FIG. 3A muestra una imagen microscópica representativa del análisis inmunohistoquímico (IHC) con lámina antihumana del tejido hígado de ratón FG, luego de la administración en la etapa de recién nacido con AAVhu68.hLáminaA de forma intravenosa a una dosis de 5×10^{10} GC (aproximadamente 3×10^{13} GC/kg). La FIG. 3B muestra una imagen microscópica representativa del análisis inmunohistoquímico (IHC) con lámina antihumana del tejido cardíaco de ratón, luego de la administración en la etapa de recién nacido de un control de vehículo. La FIG. 3C muestra una imagen microscópica representativa del análisis inmunohistoquímico (IHC) con lámina antihumana del tejido cardíaco de ratón, luego de la administración en la etapa de recién nacido con AAVhu68.hLáminaA de forma intravenosa a una dosis de 5×10^{10} GC (aproximadamente 3×10^{13} GC/kg). La FIG. 7A muestra una imagen representativa del análisis de histología del tejido cardíaco en ratones inactivados luego de la administración de PBS en ratones con inactivación. La FIG. 7B muestra una imagen representativa de análisis histología del tejido cardíaco en ratones con inactivación luego de la administración de AAV-LMNA en ratones con inactivación, lo que confirma la expresión de LMNA en células cardíacas ventriculares.

[0170] A continuación, se examinó la eficacia del tratamiento con rAAV.hLáminaA en el ritmo cardíaco en ratones con inactivación de Lámina A. Se llevaron a cabo el electrocardiograma y el ecocardiograma de acuerdo con los protocolos establecidos y publicados en la bibliografía. La FIG. 4A muestra una análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR en el tiempo, en ratones con inactivación de Lámina A a los que se les administró AAV (0-23). La FIG. 4B muestra una análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR en el tiempo, en ratones con inactivación de Lámina A a los que se les administró AAV (24-48). La FIG. 4C muestra un análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR durante el tiempo en ratones WT a los que se les administra un vehículo (PBS) (0-12). La FIG. 4D muestra un análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR durante el tiempo en ratones WT

a los que se les administra un vehículo (PBS) (13-26). En comparación, se observó bradicardia en ratones con inactivación de Lámina A tratados con un vehículo (PBS) (FIGS 5A a 5D). La FIG. 5A muestra un análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR en el tiempo en ratones inactivación de Lámina A a los que se les administró un vehículo (PBS) (0-18). La FIG. 5B muestra un análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR en el tiempo en ratones con inactivación de Lámina A a los que se les administró un vehículo (PBS) (19-38). La FIG. 5C muestra un análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR en el tiempo en ratones con inactivación de Lámina A a los que se les administró un vehículo (PBS) (ampliación en 5A, tiempo 0-10). La FIG. 5D muestra un análisis de cardiograma representativo que muestra uno o más intervalos RR en el tiempo en ratones con inactivación de Lámina A a los que se les administró un vehículo (PBS) (ampliación en 5B, tiempo 7,00-7,45). La FIG. 6A muestra los resultados del ecocardiograma en ratones con inactivación (KO) y de tipo salvaje (WT) a los que se les administró un vehículo (PBS) o AAV, graficados como la fracción de eyección (%) (Kruskal-Wallis no paramétrico con Anova de una vía con una prueba de comparación múltiple de Dunn: $P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,01$, $****P < 0,0001$). La FIG. 6B muestra los resultados del ecocardiograma en ratones con inactivación (KO) y de tipo salvaje (WT) a los que se les administró un vehículo (PBS) o AAV, graficados como un acortamiento fraccional (%) (Kruskal-Wallis no paramétrico con Anova de una vía con una prueba de comparación múltiple de Dunn $P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,01$, $****P < 0,0001$). La FIG. 6C muestra los resultados del ecocardiograma en ratones con inactivación (KO) y de tipo salvaje (WT) a los que se les administró un vehículo (PBS) o AAV, graficados como el volumen sistólico (pL) (Kruskal-Wallis no paramétrico con Anova de una vía con una prueba de comparación múltiple de Dunn: $P < 0,05$, $**P < 0,01$, $***P < 0,01$, $****p < 0,0001$).

[0171] Adicionalmente, se examinó la eficacia de AAVhu95.CMVe.chTNTp.LáminaA.rBG (AAVhu95-LMNA) Brevemente, los ratones tratados con AAVhu95-LMNA, y la expresión se examinó con transferencia Western en el día 5. La FIG. 8 muestra un análisis de transferencia western representativa para

determinar la expresión de LMNA en ratones a los que se les administró AAVhu95-LMNA. El anticuerpo utilizado en el análisis de transferencia western mostró una afinidad baja para LMNA de ratón endógena.

[0172] Adicionalmente, se examinó la eficacia de AAVhu95-LMNA en ratones heterocigotos. La FIG. 9a muestra los resultados del estudio de telemetría de LMNA graficados como el porcentaje de WT-PBS de la expresión de LMNA en ratones de tipo salvaje y con inactivación heterocigota luego de la administración con PBS (control) o AAV-LMNA. La FIG. 9B muestra los resultados del estudio de telemetría de LMNA graficados como el porcentaje de WT-PBS de la expresión de LMNC en ratones de tipo salvaje y con inactivación heterocigota luego de la administración con PBS (control) o AAV-LMNA. La FIG. 9C muestra un análisis de transferencia western representativo de muestras cardíacas para la expresión de Lámina A y Lámina C en ratones (ratones de tipo salvaje y con inactivación heterocigota) a los que se les administró AAVhu95-LMNA. Estos resultados muestran que la expresión de Lámina A aumenta significativamente en los corazones de los ratones tratados con AAVhu95-LMNA en el día 120.

[0173] En resumen, en el modelo de fenotipo de ratón con inactivación se observó una tasa de supervivencia baja luego de las 6 semanas, varios ratones disminuyeron su peso corporal, también se observó una tendencia hacia la disminución del acortamiento fraccional (FS) y la fracción de eyección (EF) y la disminución del volumen sistólico (SV) en el ecocardiograma, también se observó núcleos de forma anómala y se sospecha arritmia como la causa del paro cardíaco. En comparación, para los ratones tratados con AAV, se observó un aumento en la supervivencia de los ratones con inactivación, un aumento confirmado de la expresión de LMNA en ratones con inactivación heterocigotos tratados.

EJEMPLO 3. Estudio de expresión y seguridad de rAAV.hLáminaA en ratones y primates no humanos NHP.

[0174] En este estudio, se llevó a cabo un estudio farmacológico con telemetría para

evaluar arritmias como causa de fallecimiento. Adicionalmente, se llevó a cabo un ecocardiograma adicional (ECG) y estudios de eco en ratones envejecidos heterocigotos para determinar laminopatía.

[0175] Luego, se llevó a cabo un estudio de seguridad y expresión en primates no humanos. En este estudio, se utilizaron lámina A humana que expresa AAVhu95 (por ejemplo, AAVhu95.CMV- IE.chTnT.hLáminaA.rBG o AAVhu95.hLáminaA o AAVhu95-LMNA). Brevemente, se le administró NHP (N=2) de forma intravenosa AAVhu95.hLáminaA a una dosis de 3×10^{13} GC/kg mediante infusión de 10 mL a una tasa de infusión de 1 mL/min. La duración del estudio es de 60 días (2 meses), durante los cuales se llevan a cabo observaciones en serie en la jaula, los signos vitales y exámenes físicos, y las muestras se toman para evaluación de CBC, química en suero, niveles de troponina I. Adicionalmente, se llevan a cabo eco y ECG en el día 0 (es decir, al inicio, antes de la administración), 1 mes y 2 meses de la duración del estudio. Al final de la duración del estudio, se lleva a cabo la necropsia y los tejidos se recolectan para determinar la histopatología y los análisis de hibridación in situ (ISH) para determinar la expresión transgénica en el corazón.

[0176] La expresión no puede ser llevada a cabo mediante IHC de proteína debido a reactividad cruzada de LáminaA humana/NHP. Se llevó a cabo un ISH, pero mostró una expresión baja en comparación con lo que se esperaba en este nivel de dosis. No es concluyente debido a que hu95 tiene un rendimiento menor en NHP en comparación con hu68 de ratón o en comparación con la referencia.

[0177] Los ratones heterocigotos no tienen un fenotipo fatal. Este estudio se llevó a cabo para observar si un fenotipo puede verse en el ECG y eventualmente ser rescatado por el tratamiento. Los ratones HET de seis meses de edad recibieron AAVhu95M199.CMV.e.chTNTp.láminaA.rBG IV (vena de la cola) a una dosis de 3×10^{13} GC/kg mediante inyección de la vena de la cola o PBS como controles; se utilizó PBS WT como controles. Se llevaron a cabo registros de ECG regulares en estos ratones con telémetros implantados. El tejido se recolectó en ~D120 y se utilizó transferencia Western. No se obtuvieron resultados concluyentes de la telemetría

debido a problemas técnicos (los electrodos no se mantuvieron en su lugar) y debido a que los controles WT también tuvieron lecturas anómalas debido a la edad. Este estudio confirmó la buena expresión en el D120 lo que sugiere la falta de expresión en NHP no se debió a la cápside a menos que hu95 se comporte de forma diferente en el ratón (buen tropismo cardiaco) con respecto a NHP.

REFERENCIAS

1. Hershberger, R., Hedges, D. y Morales, A. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nat Rev Cardiol* 10, 531-547 (2013).
2. Parks SB, Kushner JD, Nauman D, et al. Lamin A/C mutation analysis in a cohort of 324 unrelated patients with idiopathic or familial dilated cardiomyopathy. *Am Heart J* 2008; 156:161-9.
3. Hasselberg et al. *European Heart Journal* (2018) 39, 853-860.
4. Kang et al. *BMB Reports* 2018;51:327-37.
5. Charron, P., et al., What Should Cardiologist know about Lamin Disease?, *Arrhythmia & Electrophysiology Review* 2012; 1(1):22-8.
6. Suguru Nishiuchi, *Circulation: Cardiovascular Genetics*. Gene-Based Risk Stratification for Cardiac Disorders in LMNA Mutation Carriers, Volumen: 10, Número: 6.
7. Hasselberg et al. *European Heart Journal* (2018) 39, 853-860.
8. Kumar, S. et al., Long-Term Arrhythmic and Nonarrhythmic Outcomes of Lamin A/C Mutation Carriers, *J Am Coll Cardiol*. nov de 2016, 68 (21) 2299-2307.
9. Ollila L., et al. Clinical disease presentation and ECG characteristics of LMNA mutation carriers, *Open Heart* 2017;4:e000474.
10. Rubinstein L.V., Gail M.H., Santner T.J., Planning the duration of a comparative clinical trial with loss to follow-up and a period of continued observation, (1981) *J Chron Dis* 8: 67-74.

[0196] Todos los documentos citados en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente mediante referencia. Solicitud de patente estadounidense n.º 63/293,680, presentada el 24 de diciembre de 2021, que se incorpora a la presente mediante

referencia en su totalidad. Si bien se describió la invención con referencia a las modalidades particulares, podrá apreciarse que pueden realizarse modificaciones sin alejarse del espíritu de la invención. Se pretende que dichas modificaciones queden comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.