

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 593**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7052 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2007 E 07810511 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 2044199**

54 Título: **Infusión coronaria epicárdica anterógrada prolongada de vectores víricos adeno-asociados que comprenden SERCA2a para la terapia génica**

30 Prioridad:

25.07.2006 US 833324 P

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

20.03.2013

73 Titular/es:

**CELLADON CORPORATION (100.0%)
12760 High Bluff Drive, Suite 240
San Diego, CA 92130 , US**

72 Inventor/es:

ZSEBO, KRISZTINA MARIA

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 398 593 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Infusión coronaria epicárdica anterógrada prolongada de vectores víricos adeno-asociados que comprenden SERCA2a para la terapia génica.

5

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

10 **[0001]** La presente invención se refiere a terapias génicas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, en particular a la liberación de polinucleótidos en tejido cardiaco.

Descripción de la técnica relacionada

15 **[0002]** Las cardiopatías constituyen un importante problema de salud pública de gran prevalencia, especialmente en el mundo occidental. Las afecciones cardiacas incluyen arteriopatía coronaria, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardiaca, cardiopatía valvular, arritmias cardiacas e inflamación cardiaca (miocarditis), por mencionar algunas. La arteriopatía coronaria y la insuficiencia cardiaca son posiblemente las más serias y prevalentes, además de ser una causa principal de fallecimiento en el mundo occidental. El impacto del infarto agudo de miocardio y de la insuficiencia cardiaca congestiva y sus secuelas en la calidad de vida de los pacientes y el coste sanitario impulsan la búsqueda de nuevas terapias.

20

25 **[0003]** La insuficiencia cardiaca congestiva (ICC) es una afección seria en la que el corazón pierde su capacidad para bombear sangre eficazmente. Datos del Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre (NHLBI) sugieren que solo en Estados Unidos, aproximadamente 5 millones de personas presentan una insuficiencia cardiaca y que cada año se diagnostican otros 550.000 casos nuevos. La ICC contribuye a o causa aproximadamente 300.000 fallecimientos al año. La enfermedad es más común en personas de 65 años o mayores, mujeres y afroamericanos. Los síntomas más comunes de la insuficiencia cardiaca son disnea, cansancio e hinchazón de tobillos, pies, piernas y, a veces, del abdomen. No hay ninguna cura para la insuficiencia cardiaca congestiva, y en la técnica existe una clara demanda de terapias eficaces.

30

35 **[0004]** Un procedimiento para el tratamiento de cardiopatías tales como la ICC que ha empezado a ser objeto de una mayor atención es la terapia génica, en la que se libera un polinucleótido, contenido típicamente en un vector vírico, en el tejido cardiaco. Se han probado numerosos medios de liberación de vectores víricos en el corazón, que incluyen la inyección directa en el miocardio (Liu y col., FASEB J. 2006; 20 (2):207-16; Li y col., Toxicol. Appl. Pharmacol., 25 de enero de 2006 (publicación electrónica); Zhu y col., Circulation. 2005; 112 (17):2650-9), la liberación intracoronaria (Nykanen y col., Circ. Res. 2006; 98(11):1373-80; Kaspar y col., J. Gene Med. 2005; 7(3):316-24), la liberación intracoronaria anterógrada basada en catéter con bloqueo de las venas coronarias (Hayase y col., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2005; 288(6):H2995-3000), el pinzamiento cruzado de la aorta y de la arteria pulmonar seguido de una inyección de vector vírico adeno-asociado en la aorta proximal (Kaspar y col., J. Gene Med. 2005; 7(3):316-24). Leiden y Svensson mencionan la infusión *in vivo* de un vector VAAr en una arteria o seno coronario en general, pero solo describen en detalle la perfusión de un corazón de ratón con un gen reportero *ex vivo* a 4°C cuando el corazón ha dejado de latir (documento WO 00/38548) - un procedimiento que no es práctico para el tratamiento de animales grandes, tales como los seres humanos. Por lo tanto, todos estos procedimientos son inadecuados para el uso en el ámbito clínico, por ejemplo porque estos procedimientos conllevan demasiados riesgos debido a la necesidad de realizar una intervención quirúrgica o una interrupción del flujo de sangre oxigenada al miocardio, por la cantidad de vector vírico requerida para llevar a la práctica el procedimiento, por el bajo porcentaje de tejido transfectado, por el hecho de que la transducción está limitada solo al sitio de inyección/administración o porque el procedimiento no es práctico o no está probado para el tratamiento de la enfermedad en animales grandes o seres humanos. Sigue existiendo una demanda de un medio simple, mínimamente invasivo pero eficaz, para liberar transgenes incluidos en vectores víricos en tejido cardiaco para tratar una enfermedad, en particular en seres humanos.

45

50

RESUMEN DE LA INVENCION

55

60 **[0005]** La presente invención se refiere a terapias para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, en particular a la liberación de agentes terapéuticos en tejido cardiaco por infusión epicárdica directa en la circulación coronaria. Una realización preferida de la invención consiste en el uso de una composición polinucleotídica terapéutica que comprende una secuencia codificante de SERCA2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de cardiopatías mediante la infusión del polinucleótido en un vaso sanguíneo de la circulación coronaria durante un periodo de al menos tres minutos sin aislar la circulación coronaria de la circulación sistémica, en la que dicho polinucleótido está empaquetado en una partícula resistente a DNasa (PRD) de un vector vírico y el número total de PRD infundidas es inferior o igual a 1×10^{14} , y en la que el polinucleótido terapéutico transfecta células cardiacas, cuyo resultado es el tratamiento, la prevención o la mejora de la cardiopatía.

- 5 **[0006]** Otra realización proporciona una composición polinucleotídica terapéutica que comprende una secuencia codificante de SERCA2a para el uso en el tratamiento o la prevención de cardiopatías mediante la infusión del polinucleótido en un vaso sanguíneo de la circulación coronaria durante un periodo de al menos tres minutos sin aislar o sin aislar sustancialmente la circulación coronaria de la circulación sistémica, en la que dicho polinucleótido está empaquetado en una partícula resistente a DNasa (PRD) de un vector vírico y el número total de PRD infundidas es inferior o igual a 1×10^{14} , y en la que el polinucleótido terapéutico transfecta células cardiacas, cuyo resultado es el tratamiento, la prevención o la mejora de la cardiopatía.
- 10 **[0007]** En algunas realizaciones, el polinucleótido se infunde en el vaso sanguíneo durante un periodo de al menos aproximadamente cinco minutos, en otras el polinucleótido se infunde en el vaso sanguíneo durante un periodo de al menos aproximadamente diez minutos, en otras se infunde en el vaso sanguíneo durante un periodo de al menos aproximadamente quince minutos.
- 15 **[0008]** En algunas realizaciones, la infusión en el vaso sanguíneo se realiza a una velocidad inferior o igual a aproximadamente 6,0 ml/min, en otras se realiza a una velocidad inferior o igual a aproximadamente 1,2 ml/min, en otras se realiza a una velocidad inferior o igual a aproximadamente 1,0 ml/min, en otras se realiza a una velocidad inferior o igual a aproximadamente 0,6 ml/min.
- 20 **[0009]** En algunas realizaciones, el vaso sanguíneo es la arteria coronaria izquierda. En algunas realizaciones, el flujo de salida de la circulación coronaria no está restringido de forma no natural.
- 25 **[0010]** En algunas realizaciones, la transfección de las células cardiacas del ventrículo lateral anterior, del ventrículo lateral inferior, del septo y del ventrículo derecho se puede detectar usando PCR.
- 30 **[0011]** En algunas realizaciones, el polinucleótido es capaz de expresar una proteína capaz de modular una actividad celular de las células cardiacas. En algunas realizaciones, la actividad celular es una ruta del ciclo de calcio de un cardiomiocito. En algunas realizaciones, la proteína es una ATPasa del retículo sarcoplasmático/endoplasmático (SERCA) y en algunas realizaciones, la SERCA es SERCA2a.
- 35 **[0012]** En una realización preferida, el polinucleótido está presente en un vector vírico seleccionado del grupo formado por un virus adeno-asociado, un adenovirus, un retrovirus, un virus del herpes simple, un papilomavirus bovino, un vector lentivírico, un virus vaccinia y un poliomavirus. En una realización más preferida, el vector vírico es el virus VAA, y en una realización más preferida, el vector vírico es un vector VAA2/1. En algunas realizaciones, el polinucleótido está unido funcionalmente a un promotor basado en el CMV y está empaquetado en el vector vírico. En una realización preferida, el polinucleótido comprende una secuencia codificante de la SERCA2a.
- 40 **[0013]** En algunas realizaciones, la transfección de las células cardiacas aumenta la fracción de acortamiento del ventrículo lateral. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano y la enfermedad es la insuficiencia cardiaca congestiva.
- 45 **[0014]** En algunas realizaciones, el polinucleótido está empaquetado en una partícula resistente a DNasa (PRD) de un vector vírico. En algunas realizaciones, el número total de PRD infundidas es inferior o igual a una cantidad seleccionada del grupo formado por 1×10^{14} , 1×10^{13} , 3×10^{12} , 1×10^{12} , 1×10^{11} , 1×10^{10} , 1×10^9 y 1×10^8 . En algunas realizaciones, el número total de PRD infundidas es inferior o igual a 1×10^{13} .
- 50 **[0015]** En una realización, el número total de PRD infundidas es inferior o igual a 1×10^{12} , el vector vírico es VAA2/1, el polinucleótido comprende una secuencia codificante de la SERCA2a, el vaso sanguíneo es la arteria coronaria izquierda o derecha y la infusión del polinucleótido dura al menos aproximadamente 10 minutos a una velocidad de flujo inferior o igual a aproximadamente 2 ml/min, y la transfección de las células cardiacas del ventrículo lateral anterior, del ventrículo lateral inferior, del septo y del ventrículo derecho se puede detectar usando PCR.
- 55 **[0016]** En algunas realizaciones, la enfermedad se selecciona del grupo formado por insuficiencia cardiaca, isquemia, arritmia, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, rechazo de trasplantes, contractilidad cardiaca anormal, cardiomiopatía no isquémica, regurgitación de la válvula mitral, estenosis o regurgitación aórtica, metabolismo anormal del Ca^{2+} y cardiopatía congénita.
- 60 **[0017]** En una realización, el vector vírico es VAA2/1, el polinucleótido comprende una secuencia codificante de la SERCA2a, el vaso sanguíneo es la arteria coronaria izquierda o derecha y la infusión del polinucleótido dura al menos aproximadamente 8 minutos a una velocidad de flujo inferior o igual a aproximadamente 2,5 ml/min, pudiéndose detectar la transfección de las células cardiacas del ventrículo lateral anterior, del ventrículo lateral inferior, del septo y del ventrículo derecho usando PCR, y la transfección de las células cardiacas aumenta la fracción de acortamiento del ventrículo lateral en al menos 25% cuando se mide aproximadamente 4 meses después de la infusión, en comparación con la fracción de acortamiento del ventrículo lateral antes de la infusión del polinucleótido.

[0018] En una realización, el mamífero es un ser humano, el vector vírico es VAA2/1, el polinucleótido comprende una secuencia codificante de la SERCA2a, el vaso sanguíneo es la arteria coronaria izquierda o derecha y la infusión del polinucleótido dura al menos aproximadamente 10 minutos. En algunas realizaciones, la enfermedad del sistema cardiovascular es la insuficiencia cardíaca congestiva. En algunas realizaciones, la infusión del polinucleótido se realiza a una velocidad de flujo de aproximadamente 6 ml/min.

[0019] En algunas realizaciones, la transfección de las células cardíacas da lugar a una mejora en un parámetro de la función cardíaca seleccionado del grupo formado por la expresión de la proteína SERCA2a, la fracción de acortamiento, la fracción de eyección, el gasto cardíaco, la constante de tiempo de relajación ventricular y el volumen regurgitante.

[0020] En algunas realizaciones, la invención comprende además la infusión de un polinucleótido en un vaso sanguíneo adicional de la circulación coronaria, infundiéndose el polinucleótido en el vaso sanguíneo adicional durante un periodo de al menos aproximadamente tres minutos. En algunas realizaciones, el mamífero es un ser humano, el vector vírico es VAA2/1, el polinucleótido comprende una secuencia codificante de la SERCA2a, el vaso sanguíneo es la arteria coronaria izquierda y la infusión del polinucleótido en la arteria coronaria izquierda dura al menos aproximadamente 6 minutos, y el vaso sanguíneo adicional es la arteria coronaria derecha y la infusión del polinucleótido en la arteria coronaria derecha dura al menos aproximadamente 3 minutos. En algunas realizaciones, la enfermedad del sistema cardiovascular es la insuficiencia cardíaca congestiva. En algunas realizaciones, la infusión del polinucleótido en la arteria coronaria izquierda y en la arteria coronaria derecha se realiza a una velocidad de flujo de aproximadamente 6 ml/min.

[0021] En algunas realizaciones, la transfección de las células cardíacas da lugar a una mejora en un parámetro de la función cardíaca seleccionado del grupo formado por la expresión de la proteína SERCA2a, la fracción de acortamiento, la fracción de eyección, el gasto cardíaco, la constante de tiempo de relajación ventricular y el volumen regurgitante.

[0022] En la presente memoria también se describe un kit que comprende: una composición farmacéutica que comprende al menos 1×10^{11} PRD del vector VAA2/1 que contiene un polinucleótido que codifica la SERCA2a; e instrucciones que indican que se debe administrar una solución que comprende al menos $0,5 \times 10^{11}$ PRD del vector VAA2/1 que contiene un polinucleótido que codifica la SRECA2a a un paciente que necesite prevenir o tratar una enfermedad cardiovascular, mediante infusión *in vivo* en un vaso sanguíneo de la circulación coronaria sin aislar, o sin aislar sustancialmente, la circulación coronaria de la circulación sistémica del paciente, infundiéndose el polinucleótido en el vaso sanguíneo durante un periodo de al menos aproximadamente tres minutos. En algunas realizaciones, el vaso sanguíneo es la arteria coronaria izquierda o derecha y la infusión del polinucleótido se realiza durante un periodo de al menos aproximadamente ocho minutos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0023] La figura 1 es un esquema que muestra las características del ADN de VAA2/1/SERCA2a (tgABG 12).

[0024] La figura 2 es una comparación esquemática del ADN de los VAA natural y recombinante.

[0025] La figura 3 es una ilustración del corazón que muestra la localización de las muestras recogidas en el experimento descrito en el ejemplo 1.

[0026] La figura 4 muestra la localización de los cebadores de PCR usados para la detección del ADN de VAA2/1/SERCA2a en muestras de tejido.

[0027] La figura 5 es un diagrama que muestra los resultados del experimento descrito en el ejemplo 1, que indican que la infusión de la misma cantidad de VAA2/1/SERCA2a durante un tiempo prolongado da lugar a más copias de VAA2/1/SERCA2a en las muestras de tejido cardíaco.

[0028] La figura 6 es un diagrama que muestra los resultados del experimento descrito en el ejemplo 2, que indican que la infusión de VAA2/1/SERCA2a da lugar, de forma dependiente de la dosis, a más copias de VAA2/1/SERCA2a que la inyección i.v.

[0029] La figura 7A representa geles de poliacrilamida que muestran la expresión de la proteína SERCA2a (arriba) y de ARNm (abajo) en animales control no experimentales, animales infundidos con la formulación (solución salina) y animales tratados con VAA2/1/SERCA2a del ejemplo 3; la figura 7B es un gráfico que compara la expresión proteica normalizada de SERCA2a en los tres grupos de tratamiento del ejemplo 3.

[0030] La figura 8 es un gráfico que muestra los resultados del experimento descrito en el ejemplo 3, que indican que la infusión coronaria epicárdica anterógrada de VAA2/1/SERCA2a da como resultado una mayor fracción de acortamiento del ventrículo izquierdo, un parámetro que indica una función cardíaca mejorada en un modelo de insuficiencia cardíaca.

5 **[0031]** La figura 9 es un gráfico que representa el cambio absoluto en la fracción de acortamiento el día 112 en comparación con el día 56.

10 **[0032]** La figura 10 es un gráfico que representa el cambio absoluto en la fracción de eyección el día 112 en comparación con el día 56.

[0033] La figura 11 es un gráfico que representa el cambio absoluto en el gasto cardíaco (ml/min) el día 112 en comparación con el día 56.

15 **[0034]** La figura 12 es un gráfico que representa el cambio absoluto en tau (constante de tiempo de relajación del ventrículo izquierdo en ms) el día 112 en comparación con el día 56.

[0035] La figura 13 es un gráfico que representa el cambio absoluto en el volumen de regurgitación (ml) el día 112 en comparación con el día 56.

20 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

[0036] La presente invención se refiere a terapias para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Una realización de la invención consiste en el uso novedoso de una composición polinucleotídica terapéutica en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cardiopatías por transfección de tejido cardíaco, para mejorar la contractilidad cardíaca en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) normalizando los niveles de calcio en los cardiomiocitos. En la realización preferida se usa un agente de transferencia génica, VAA2/1/SERCA2a, infundido *in vivo* directamente en la circulación coronaria durante un periodo de tiempo no inferior a aproximadamente tres minutos, durante el cual la circulación coronaria no se aísla de la circulación sistémica del animal ni se restringe de ninguna otra manera no natural.

[0037] Como se usa en la presente memoria, "polinucleótido" posee su significado corriente y habitual en la técnica e incluye cualquier ácido nucleico polimérico, tal como moléculas de ADN o ARN, así como derivados químicos conocidos para los expertos en la técnica. Los polinucleótidos no solo incluyen aquellos que codifican una proteína terapéutica, sino también secuencias que se pueden usar para reducir la expresión de una secuencia de ácido nucleico diana usando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, ácidos nucleicos de sentido contrario, interferentes o interferentes pequeños). Un ejemplo es una secuencia que reduce o elimina la expresión de fosfolamban. Los polinucleótidos también se pueden usar para iniciar o incrementar la expresión de una secuencia de ácido nucleico diana o la producción de una proteína diana dentro de las células del sistema cardiovascular. Los ácidos nucleicos y proteínas diana incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos y proteínas que se encuentran normalmente en el tejido diana, derivados de tales ácidos nucleicos o proteínas presentes en la naturaleza, ácidos nucleicos o proteínas presentes en la naturaleza que no se encuentran normalmente en el tejido diana o ácidos nucleicos o proteínas sintéticos. Se pueden usar uno o más polinucleótidos combinados, administrados simultánea y/o sucesivamente, para incrementar y/o reducir una o más secuencias de ácido nucleico o proteínas diana.

[0038] Como se usan en la presente memoria, los términos "infusión", "infundido" e "infundiendo" poseen su significado corriente y habitual en la técnica y se refieren a la administración durante un periodo de tiempo (típicamente de un minuto o más) que es sustancialmente más largo que el término reconocido en la técnica de "inyección" o "inyección en bolo" (típicamente inferior a un minuto). La velocidad de flujo de la infusión dependerá, al menos en parte, del volumen administrado, si bien la velocidad de flujo de una "infusión" es menor que la de una "inyección" para el mismo volumen.

[0039] Una "cantidad eficaz" posee su significado corriente y habitual en la técnica e incluye una cantidad suficiente para ejercer o lograr un efecto terapéutico beneficioso o deseado. Por ejemplo, una "cantidad eficaz" es una cantidad que logra cualquiera de los efectos siguientes: un aumento de la fracción de acortamiento del ventrículo lateral; y/o una paliación, mejora, estabilización, inversión, ralentización o retraso en la progresión o en una señal o síntoma del estado patológico. La cantidad eficaz se puede administrar en una o más tomas.

[0040] Como se usan en la presente memoria, "junto con", "en combinación con", "concurrente" o "concurrentemente" poseen su significado corriente y habitual en la técnica e incluyen la administración de una modalidad terapéutica además de otra modalidad terapéutica. Por ejemplo, la infusión de un polinucleótido de la presente invención a un sujeto además de la administración de una composición farmacéutica reconocida en la técnica al mismo individuo. Como se usan en la presente memoria, estos términos incluyen la administración simultánea, así como la administración sucesiva de las modalidades terapéuticas.

[0041] Como se usa en la presente memoria, "tratar" o "tratamiento" de una enfermedad posee su significado corriente y habitual en la técnica e incluye la estabilización, la cura o la cura no del todo completa de una enfermedad, incluyendo la detención o ralentización de la progresión de una enfermedad o de una señal o síntoma de la enfermedad. El término "prevención" posee su significado corriente y habitual en la técnica e incluye la prevención completa o incompleta o un retraso en el inicio de una enfermedad o de una señal o síntoma de una enfermedad. Los términos "terapéutico", "efecto terapéutico" o "efecto clínico" incluyen tanto el tratamiento como la prevención. Ejemplos de enfermedades que se pretenden tratar usando la presente invención y que están asociadas con el sistema cardiovascular incluyen, pero no se limitan a, insuficiencia cardiaca, isquemia, arritmia, infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, rechazo de trasplantes, contractilidad cardiaca anormal, cardiomiopatía no isquémica, regurgitación de la válvula mitral, estenosis o regurgitación aórtica, metabolismo anormal del Ca^{2+} y cardiopatía congénita. Los resultados clínicos o efectos terapéuticos beneficiosos o deseados incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, un mayor alivio de las señales o síntomas de una enfermedad cardiovascular, una mayor disminución de la extensión de la enfermedad, la estabilización (es decir, el no empeoramiento) del estado patológico, el retraso o la ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado patológico y la remisión (bien parcial o bien total), bien detectable o bien no detectable. Otros ejemplos del efecto terapéutico incluyen, pero no se limitan a, una mayor fracción de acortamiento del ventrículo lateral; una mayor contractilidad cardiaca a nivel celular y del animal intacto, la inversión del remodelado cardiaco y la normalización de los niveles diastólicos anormalmente elevados de calcio citosólico. Otras características clínicas que se pueden mejorar en un sujeto tratado con una realización de la presente invención incluyen, sin limitación, la supervivencia, el metabolismo cardiaco, la contractilidad cardiaca, la frecuencia cardiaca, la función ventricular (por ejemplo, la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI), la presión sistólica del ventrículo izquierdo (PSVI)), el metabolismo del Ca^{2+} (por ejemplo, la concentración intracelular de Ca^{2+} , la $[\text{Ca}^{2+}]$ máxima o en reposo, la actividad Ca^{2+} -ATPasa del RS, el estado de fosforilación de fosfolamban), la generación de fuerza, la relajación y presión del corazón, la relación fuerza/frecuencia, la supervivencia o apoptosis de cardiocitos o la actividad de los canales iónicos (por ejemplo, intercambiadores de sodio/calcio, actividad de los canales de sodio, actividad de los canales de calcio, actividad de la bomba ATPasa de sodio/potasio), la actividad de la cadena pesada de miosina, troponina I, troponina C, troponina T, tropomiosina, actina, miosina cinasa de cadena ligera, cadena ligera 1 de miosina, cadena ligera 2 de miosina o cadena ligera 3 de miosina, receptor de IGF-1, PI3-cinasa, AKT-cinasa, intercambiador de sodio/calcio, canal de calcio (L y T), calsecuestrina o calreticulina. Otros parámetros de una cardiopatía que se pueden mejorar incluyen la fracción de acortamiento, el gasto cardiaco, la fracción de eyección, tau, el volumen de regurgitación, menos estancias en hospital, mejor calidad de vida y mayor tiempo de esfuerzo.

[0042] Como se usa en la presente memoria, los ácidos nucleicos o genes "exógenos" son aquellos que no existen de forma natural en el vector usado para la transferencia de ácido nucleico; por ejemplo, que no se encuentran de forma natural en el vector vírico, pero el término no pretende excluir ácidos nucleicos que codifican una proteína o un polipéptido que existe de forma natural en el paciente o el huésped, por ejemplo la SERCA.

[0043] Como se usa en la presente memoria, "célula cardiaca" incluye cualquier célula del corazón que esté implicada en el mantenimiento de una estructura o que desempeñe una función del corazón, como una célula miocárdica, una célula de la vasculatura cardiaca o una célula presente en una válvula cardiaca. Las células cardiacas incluyen cardiomiocitos (con propiedades eléctricas tanto normales como anormales), células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos, células del tejido de conducción, células cardiacas marcapasos y neuronas.

[0044] Como se usa en la presente memoria, "aislado", "sustancialmente aislado" o "en gran parte aislado" y sus variantes son términos que no requieren un aislamiento completo o absoluto de la circulación coronaria venosa, cardiaca, sistémica venosa o sistémica; más bien pretenden indicar que se aísla la mayoría, preferentemente la mayor parte o incluso sustancialmente toda la circulación especificada. Como se usa en la presente memoria, "parcialmente aislado" se refiere al aislamiento de cualquier porción no trivial de la circulación especificada.

[0045] Como se usa en la presente memoria, "restringido de forma no natural" incluye cualquier procedimiento de restricción del flujo de líquido a través de un vaso sanguíneo, por ejemplo un catéter con globo, suturas, etc., pero no incluye restricciones producidas de forma natural, por ejemplo la formación de placas (estenosis). La restricción no natural incluye el aislamiento sustancial o total de, por ejemplo, la circulación coronaria.

[0046] Como se usa en la presente memoria, "modular" posee su significado corriente y abarca tanto el aumento como la disminución de la expresión o actividad de la diana.

[0047] Como se usa en la presente memoria, la expresión "mínimamente invasivo" pretende incluir cualquier procedimiento que no requiera una cirugía abierta para acceder al corazón o a los vasos estrechamente asociados al corazón. Tales procedimientos incluyen el uso de medios endoscópicos para acceder al corazón, así como medios basados en catéteres que dependen del acceso a través de arterias y venas grandes, tales como la arteria femoral.

[0048] Como se usa en la presente memoria, la expresión "virus adeno-asociado" o "VAA" abarca todos los subtipos, serotipos y pseudotipos, así como formas presentes en la naturaleza y recombinantes. En la técnica se conoce una diversidad de serotipos y cepas de VAA que se pueden adquirir públicamente de fuentes tales como la ATCC y de fuentes académicas o comerciales. De forma alternativa, se pueden sintetizar secuencias de serotipos y cepas de VAA publicadas y/o disponibles en una diversidad de bases de datos, usando técnicas conocidas.

[0049] Como se usa en la presente memoria, el término "serotipo" se refiere a un VAA que se identifica y se distingue de otros VAA en base a la reactividad de las proteínas de la cápsida con antisueros definidos. Existen al menos doce serotipos conocidos del VAA humano, que incluyen VAA1 a VAA12, aunque se siguen descubriendo serotipos adicionales y se contempla el uso de serotipos recién descubiertos. Por ejemplo, el serotipo VAA2 se usa para referirse a un VAA que contiene proteínas de la cápsida codificadas por el gen cap de VAA2 y un genoma que contiene secuencias repetidas terminales invertidas (RTI) 5' y 3' del mismo serotipo VAA2.

[0050] Un VAA "pseudotipado" se refiere a un VAA que contiene proteínas de la cápsida de un serotipo y un genoma vírico que incluye repeticiones terminales invertidas (RTI) 5' y 3' de un serotipo diferente o heterólogo. Se esperaría que un VAAr pseudotipado presente propiedades de unión a la superficie celular del serotipo de la cápsida y propiedades genéticas coherentes con el serotipo de las RTI. Un VAAr pseudotipado puede comprender proteínas de la cápsida del VAA que incluyen las proteínas de la cápsida VP1, VP2 y VP3 y RTI de cualquier serotipo del VAA que incluye cualquier serotipo del VAA de primates de VAA1 a VAA12, siempre que la proteína de la cápsida sea de un serotipo heterólogo con respecto al (los) serotipo(s) de las RTI. En un VAAr pseudotipado las RTI 5' y 3' pueden ser idénticas o heterólogas. Los VAAr pseudotipados se producen usando técnicas convencionales descritas en la técnica.

[0051] Un vector VAAr "quimérico" abarca un vector VAA que comprende proteínas de la cápsida heterólogas; es decir, un vector VAAr puede ser quimérico con respecto a sus proteínas de la cápsida VP1, VP2 y VP3, de modo que VP1, VP2 y VP3 no son todas del mismo serotipo del VAA. Un VAA quimérico como se usa en la presente memoria abarca VAA en los que las proteínas de la cápsida VP1, VP2 y VP3 difieren en cuanto a los serotipos, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, proteínas de la cápsida de VAA1 y VAA2; son mezclas de proteínas de la cápsida de otros parvovirus o comprenden proteínas de otros virus u otras proteínas, como, por ejemplo, proteínas que dirigen la liberación del VAA en las células o tejidos deseados. Un VAAr quimérico como se usa en la presente memoria también abarca un VAAr que comprende RTI 5' y 3' quiméricas. La presente invención abarca vectores VAAr quiméricos que comprenden RTI de diferentes serotipos de VAA, por ejemplo de VAA1 y VAA2, o un VAAr quimérico puede comprender secuencias sintéticas.

[0052] Los vectores víricos VAAr se pueden producir mediante cualquiera de una serie de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen estrategias de transfección transitoria como las que se describen en las patentes de Estados Unidos nº 6,001,650 y 6,258,595. Típicamente, la producción de vectores VAAr requiere cuatro elementos comunes: 1) una célula huésped permisiva para la replicación, que incluye células huésped convencionales conocidas en la técnica, incluidas las líneas celulares 293-A, 293-S (adquiridas de BioReliance), VERO y HeLa, que se pueden aplicar en los sistemas de producción de vectores descritos en la presente memoria; 2) una función vírica auxiliar que se suministra en forma de un plásmido, pAd Helper 4.1, que expresa los genes E2a, E4-orf6 y VA del adenovirus tipo 5 (Ad5) cuando se usa en sistemas de producción por transducción; 3) una construcción de trans-empaquetamiento rep-cap; y 4) un gen de interés flanqueado por secuencias RTI de VAA. La producción por transfección se puede realizar como se describe en el artículo de Sandalon y col., J. Virology, 2004; 78(22): 12355-12365.

Procedimiento terapéutico

[0053] En una realización preferida de la invención, el uso del agente terapéutico, por ejemplo del polinucleótido/ vector vírico descrito con más detalle más adelante, consiste en su administración al sujeto por infusión en un vaso sanguíneo de la circulación coronaria del corazón latiente *in vivo* durante un periodo de al menos aproximadamente tres minutos en un vaso sanguíneo concreto. En modelos del corazón humano y de enfermedades cardiovasculares en animales grandes los solicitantes han descubierto que, inesperadamente, para la administración de vectores víricos es más eficaz un tiempo de infusión relativamente largo, cuyo resultado es una eficacia de transferencia génica al tejido cardíaco mayor que la de una inyección en bolo o un tiempo de infusión corto (por ejemplo, ≤ 1 minuto) con la misma cantidad de vector vírico. La mayor eficacia de infusión se puede medir mediante un mayor número de copias del transgén por célula, una mayor expresión del transgén a nivel de ARNm y/o de proteína por célula o en el tejido y/o un mayor porcentaje de células transfectadas de un tejido concreto, por ejemplo cardiomiocitos, en comparación con una inyección. Los solicitantes han demostrado que en modelos de animales grandes, el resultado es un tratamiento exitoso de los modelos de enfermedades cardiovasculares humanas. Además, los solicitantes han descubierto que, usando tiempos de infusión relativamente largos, no es necesario aislar la circulación coronaria de la circulación sistémica o recircular de otra manera el agente terapéutico, ni restringir artificialmente la circulación coronaria venosa como medio para aumentar la presión en la circulación coronaria o aumentar el tiempo de permanencia del agente terapéutico. Tampoco es necesario tratar previamente el

tejido cardiaco con otros agentes, tales como agentes vasoactivos (por ejemplo, histamina, agonistas de histamina o un factor de crecimiento endotelial vascular), enfriar el corazón, parar el corazón o retirar el corazón del animal para la perfusión. En cambio, el procedimiento de los solicitantes se puede llevar a cabo en un laboratorio de cateterismo convencional usando los catéteres existentes para la administración. Así pues, los solicitantes han descubierto una manera sencilla, práctica y eficaz de usar la terapia génica para tratar enfermedades cardiovasculares en animales grandes, tales como seres humanos.

[0054] En una realización preferida de la invención, el uso del agente terapéutico consiste en su administración al sujeto por infusión en un vaso sanguíneo de la circulación coronaria. La circulación coronaria proporciona riego sanguíneo al tejido del corazón. Existen numerosas arterias coronarias. Normalmente, cuatro arterias coronarias principales proporcionan sangre oxigenada al corazón para su distribución en el tejido cardiaco: las arterias coronarias izquierda principal y derecha, la arteria descendente anterior izquierda y la arteria circunfleja izquierda. Se contempla la infusión de una o de una combinación de estas arterias, por ejemplo la infusión de las arterias coronarias izquierda y derecha. En la realización preferida se usa una infusión epicárdica anterógrada de las arterias coronarias principales izquierda y derecha. Asimismo se contempla la infusión retrógrada de una arteria coronaria o de una combinación de una o más arterias o venas coronarias anterógradas y retrógradas. La infusión del (los) vaso(s) sanguíneo(s) coronario(s) se efectúa usando alambres guía, catéteres y bombas de infusión convencionales. En una realización preferida, el catéter de infusión se dirige a la arteria coronaria bajo guiado fluoroscópico a través de la arteria femoral. Como se usa en la presente memoria, "vaso sanguíneo de la circulación coronaria", "vaso sanguíneo coronario" o "vaso sanguíneo del corazón" incluye injertos en vasos sanguíneos coronarios, por ejemplo los que se generan por cirugía de derivación. Como se usa en la presente memoria, "epicárdico" se refiere a los vasos sanguíneos localizados en la porción exterior del corazón, por ejemplo las arterias coronarias izquierda o derecha.

[0055] Una vez colocado el catéter de infusión en el vaso sanguíneo coronario diana, se infunde el agente terapéutico en el vaso sanguíneo, preferentemente mediante una bomba de infusión programable. El tiempo dedicado a la infusión del agente terapéutico es un factor importante para obtener una eficacia de transferencia génica efectiva y superior. Los solicitantes han determinado que un tiempo de infusión de al menos aproximadamente 3 minutos en un vaso sanguíneo concreto es más eficaz que una inyección en bolo o un tiempo de infusión más corto. Preferentemente, el tiempo de infusión es de al menos aproximadamente 8 minutos, con especial preferencia de al menos aproximadamente 10 minutos, aunque se contemplan tiempos de infusión de al menos aproximadamente 15 minutos. Los solicitantes también consideran que el tiempo de infusión es, es de aproximadamente, es de al menos, es de al menos aproximadamente, no es superior a o no es superior a aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 minutos o se encuentra en un intervalo definido por cualesquiera dos de estos valores.

[0056] Puesto que la infusión implica típicamente el uso de un catéter y de tubos de conexión que presentan un cierto volumen muerto, el dispositivo de infusión con frecuencia se impregna con una solución portadora, por ejemplo con sangre del sujeto, que no contiene ningún agente terapéutico. Por lo tanto, el agente terapéutico no se administra inmediatamente a la circulación coronaria cuando se pone en marcha la bomba de infusión. Igualmente, cuando se vacía la jeringa que contiene el agente terapéutico, típicamente queda cierta cantidad de agente terapéutico en el volumen muerto del tubo de conexión y del catéter. Inmediatamente después de la infusión del agente terapéutico, el volumen muerto se lava con una solución apropiada, preferentemente a la misma velocidad de flujo que se use para administrar el agente terapéutico. A diferencia del desplazamiento del volumen muerto en el aparato de infusión, el periodo de tiempo durante el cual el agente terapéutico se libera realmente a la circulación coronaria es el "tiempo de infusión" al que se ha hecho referencia anteriormente. Por ejemplo, si se cargan 3 ml de agente terapéutico en un aparato de infusión con un volumen muerto de 3 ml y la velocidad de infusión es de 1 ml/min, el tiempo requerido para infundir el agente terapéutico en la circulación coronaria es de tan solo 3 minutos, mientras que el tiempo total requerido para administrar los 3 ml de agente terapéutico y 3 ml de volumen muerto es de 6 minutos. En algunas realizaciones, el catéter y todos los tubos de conexión se impregnan con el agente terapéutico, de manera que el volumen muerto no es un problema. De forma similar, la cantidad eficaz de agente terapéutico se podría liberar sin necesidad de lavar los tubos. Sin embargo, el resultado es que queda agente terapéutico en los tubos, desechándose el agente terapéutico.

[0057] Los solicitantes contemplan que el agente terapéutico se infunda a una velocidad de flujo que es, es de aproximadamente, es de al menos, es de al menos aproximadamente, no es superior a o no es superior a aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 o 10,0 ml/min o se encuentra en un intervalo definido por cualesquiera dos de estos valores. Preferentemente, la velocidad de flujo se encuentra entre aproximadamente 0,2 ml/min y aproximadamente 6,0 ml/min, con más preferencia entre aproximadamente 0,2 ml/min y aproximadamente 2,5 ml/min, con especial preferencia entre aproximadamente 0,2 ml/min y aproximadamente 2,0 ml/min. Los expertos en la técnica reconocerán que la liberación del agente terapéutico se puede realizar sin bomba de infusión, aunque el uso de una bomba de infusión permite lograr velocidades de flujo más precisas y una liberación más uniforme.

[0058] La cantidad total de partículas víricas o de partículas resistentes a DNasa (PRD) liberadas por infusión para proporcionar una cantidad eficaz se encuentra preferentemente entre 1×10^{14} y aproximadamente 1×10^{11} , con más preferencia entre aproximadamente 3×10^{12} y 1×10^{12} y con especial preferencia en aproximadamente 1×10^{12} .

5 Sin embargo, los solicitantes también consideran que la cantidad total de partículas víricas o de PRD es, es de aproximadamente, es de al menos, es de al menos aproximadamente, no es superior a o no es superior a aproximadamente 1×10^{14} , 9×10^{13} , 8×10^{13} , 7×10^{13} , 6×10^{13} , 5×10^{13} , 4×10^{13} , 3×10^{13} , 2×10^{13} , 1×10^{13} , 9×10^{12} , 8×10^{12} , 7×10^{12} , 6×10^{12} , 5×10^{12} , 4×10^{12} , 3×10^{12} , 2×10^{12} , 1×10^{12} , 9×10^{11} , 8×10^{11} , 7×10^{11} , 6×10^{11} , 5×10^{11} , 4×10^{11} , 3×10^{11} , 2×10^{11} , 1×10^{11} , 9×10^{10} , 8×10^{10} , 7×10^{10} , 6×10^{10} , 5×10^{10} , 4×10^{10} , 3×10^{10} , 2×10^{10} , 1×10^{10} , 9×10^9 , 8×10^9 , 7×10^9 , 6×10^9 , 5×10^9 , 4×10^9 , 3×10^9 , 2×10^9 , 1×10^9 , 9×10^8 , 8×10^8 , 7×10^8 , 6×10^8 , 5×10^8 , 4×10^8 , 3×10^8 , 2×10^8 o 1×10^8 , o se encuentra en un intervalo definido por cualesquiera dos de estos valores.

[0059] El número de PRD infundidas a lo largo de un tiempo dado es una función de la concentración de la solución que se infunda y de la velocidad de flujo. La velocidad de infusión de las PRD o de las partículas víricas se encuentra preferentemente entre aproximadamente 1×10^8 /min y aproximadamente 1×10^{14} /min, con más preferencia entre aproximadamente 5×10^{10} /min y aproximadamente 5×10^{12} /min, con más preferencia entre aproximadamente 3×10^{10} /min y aproximadamente 1×10^{12} /min, con especial preferencia entre aproximadamente 6×10^{10} /min y aproximadamente 4×10^{11} /min. En una realización preferida, la velocidad de infusión de las PRD o de las partículas víricas es de 1×10^{11} /min, y en otra realización preferida es de $1,25 \times 10^{11}$ /min.

[0060] En una realización, el agente terapéutico se administra a un único vaso sanguíneo del corazón. En otra realización, 2/3 del volumen total del agente terapéutico se libera en un vaso sanguíneo del corazón y 1/3 se administra a otro vaso sanguíneo del corazón. En otra realización, se infunden más de 2 vasos sanguíneos coronarios (por ejemplo, 3, 4, 5 o más), y la porción del volumen total de infusión que contiene el agente terapéutico administrada por vaso sanguíneo se puede ajustar según sea conveniente. El objetivo de la infusión es proporcionar una exposición miocárdica difusa y homogénea al VAA2/1/SERCA2a por infusión coronaria epicárdica anterógrada. Existen múltiples escenarios de infusión basados en patrones de colateralización, enfermedades oclusivas y variaciones anatómicas (por ejemplo, la anatomía presente tras una cirugía de derivación), pero el objetivo del clínico es liberar 1/3 de VAA2/1/SERCA2a en el miocardio anterolateral, 1/3 en el posterolateral y 1/3 en el inferior/inferolateral. La anatomía se define mediante angiografía coronaria y pontografía para conseguir una liberación homogénea en el miocardio perfundido. Además, un experto en la técnica reconocerá que, aunque las ovejas y los cerdos constituyen modelos animales aceptados para estudios cardiovasculares en seres humanos, el 90% de las ovejas y de los cerdos presenta un patrón izquierdo dominante. En comparación, aproximadamente un 10% de la población humana presenta un patrón izquierdo dominante, presentando el 90% restante un patrón derecho o co-dominante (Vlodaver Z. y col. Coronary Heart Disease: Clinical, Angiographic, and Pathologic Profiles. Springer-Verlag, Nueva York. 1976). Una serie patológica sugiere que un 71% de los pacientes presenta un patrón derecho dominante, un 17% un patrón co-dominante y un 12% un patrón izquierdo dominante (McAlpine W. Heart and Coronary Arteries. Springer-Verlag, 1975). Por lo tanto, para lograr en los seres humanos una perfusión del ventrículo izquierdo similar a la de cerdos/ ovejas, el escenario de infusión óptimo puede diferir.

[0061] Para dos vasos sanguíneos se prefiere dividir el volumen de la solución en 1/3 y 2/3, si bien la porción del volumen de inyección infundida en un vaso sanguíneo concreto puede ser un volumen que es, es aproximadamente, es al menos, es al menos aproximadamente, no es superior a o no es superior a aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 u 80% del volumen total o se encuentra en un intervalo definido por cualesquiera dos de estos valores. El volumen total de la solución que contiene el agente terapéutico variará en función del tamaño del animal que se esté tratando. Para un sujeto humano se prefiere un volumen total de agente terapéutico de 60 ml. Sin embargo, el volumen total de agente terapéutico puede ser un volumen que es, es de aproximadamente, es de al menos, es de al menos aproximadamente, no es superior a o no es superior a aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 o 150 ml o se encuentra en el intervalo definido por cualesquiera dos de estos valores.

[0062] Los agentes terapéuticos descritos en la presente memoria pueden encontrarse en solución, preferentemente en una composición farmacéutica adecuada para la administración directa a la circulación coronaria. Los ingredientes de una composición farmacéutica aceptable son conocidos para los expertos en la técnica y pueden incluir elementos tales como un tampón y un vehículo adecuado. En otra realización, la composición farmacéutica que contiene un agente terapéutico, por ejemplo un vector vírico y, con más preferencia, un vector VAA2/1/SERCA2a, forma parte de un kit. En algunas realizaciones, el kit contiene una solución madre del agente terapéutico y una solución para diluir la solución madre. El kit incluye asimismo instrucciones para la administración del vector vírico, preferentemente por infusión directa en la circulación coronaria, como se describe en cualquiera de las realizaciones descritas en la presente memoria. De forma similar, los agentes terapéuticos descritos en la presente memoria se pueden usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad descrita en la presente invención, infundiéndose el medicamento directamente en la circulación cardiaca.

Procedimientos de liberación del polinucleótido

5 **[0063]** Un aspecto de la presente invención contempla la transferencia de un polinucleótido terapéutico a una célula. Para esta transferencia se pueden usar procedimientos de transferencia génica víricos o no víricos. En esta sección se comentarán los procedimientos y composiciones de transferencia génica o de ácidos nucleicos que incluyen la transferencia de secuencias de sentido contrario, interferentes e interferentes pequeñas.

10 **[0064]** En una realización, los polinucleótidos terapéuticamente significativos se incorporan en un vector vírico para mediar la transferencia a una célula. También se pueden transferir por transducción vírica usando partículas víricas infecciosas, por ejemplo por transformación con un virus adeno-asociado (VAA) de la presente invención, construcciones de expresión adicionales que codifiquen otros agentes terapéuticos descritos en la presente memoria. De forma alternativa, se puede usar un retrovirus, un papilomavirus bovino, un vector de adenovirus, un vector lentivírico, un virus vaccinia, un poliomavirus o un virus infeccioso que se haya manipulado para que exprese. De forma similar, se pueden usar procedimientos no víricos, que incluyen, pero no se limitan a, liberación directa de ADN por perfusión, transfección de ADN desnudo, transfección mediada por liposomas, encapsulación y endocitosis mediada por receptores. Estas técnicas son conocidas para los expertos en la técnica, y sus peculiaridades no son el centro de la presente invención y, por lo tanto, no necesitan ser detalladas exhaustivamente en la presente memoria. Sin embargo, en una realización preferida se usa un vector vírico para la transducción de células cardíacas con el fin liberar un polinucleótido terapéuticamente significativo en una célula. El virus puede acceder al interior de la célula mediante un mecanismo específico, tal como endocitosis mediada por receptores, o mediante un mecanismo no específico, tal como pinocitosis.

25 **[0065]** A continuación se describirán numerosos ejemplos de vectores. Se apreciará que la exposición siguiente no es exhaustiva.

Vectores víricos adeno-asociados

30 **[0066]** En una realización preferida de la invención se usan partículas víricas adeno-asociadas recombinantes (VAAR) pseudotipadas, incompetentes para la replicación y purificadas. Los virus adeno-asociados (VAA) son parvovirus pertenecientes al género *Dependovirus*. Son virus pequeños, no envueltos, de ADN de hebra sencilla que requieren un virus auxiliar para replicarse. Es necesaria la co-infección con un virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus, herpesvirus o virus vaccinia) para formar viriones VAA funcionalmente completos. *In vitro*, en ausencia de co-infección con un virus auxiliar, el VAA se mantiene en un estado latente en el que el genoma vírico existe en una forma episómica, pero no se producen viriones infecciosos. La infección siguiente con un virus auxiliar "rescata" el genoma, permitiendo su replicación y empaquetamiento en cápsidas víricas y reconstituyendo de este modo el virión infeccioso. Datos recientes indican que, *in vivo*, tanto el VAA natural como el VAA recombinante existen predominantemente en forma de grandes concatémeros episómicos.

40 **[0067]** Los VAA no están asociados a ninguna enfermedad humana conocida, generalmente no se consideran patógenos y, una vez integrados, no parecen alterar las propiedades fisiológicas de la célula huésped. Los VAA pueden infectar un amplio espectro de células huésped, incluidas las células que no se están dividiendo, y pueden infectar células de diferentes especies. Al contrario que algunos vectores que son destruidos o inactivados por respuestas tanto celulares como humorales, los vectores VAA han mostrado *in vivo* una expresión persistente en diversos tejidos. La persistencia *in vivo* de los vectores VAA recombinantes en células que no se dividen puede atribuirse a la falta de genes víricos nativos del VAA y a la capacidad del vector para formar concatémeros episómicos.

50 **[0068]** El virus adeno-asociado (VAA) es un atractivo sistema de vector para el uso en la transducción de células de la presente invención, puesto que presenta una alta frecuencia de persistencia en forma de concatémero episómico y puede infectar células que no se dividen, por lo que resulta de utilidad para la liberación de genes en células de mamíferos, por ejemplo en cultivos tisulares e *in vivo*. Los estudios que han demostrado el uso del VAA en la liberación de genes incluyen Flotte y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993; 90:10613-17, y Walsh y col., J. Clin. Invest., 1994; 94:1440-48. Los vectores VAA recombinantes se han usado con éxito en la transducción *in vitro* e *in vivo* de genes marcadores y de genes implicados en enfermedades humanas (véase, por ejemplo, Walsh y col., J. Clin. Invest. 1994; 94:1440-48). El VAA presenta un amplio espectro de huéspedes que puede infectar. En la patente de Estados Unidos nº 5,139,941 y/o en la patente de Estados Unidos nº 4,797,368 se describen detalles relacionados con la generación y el uso de los vectores VAAR.

60 **[0069]** Típicamente, el virus VAA recombinante (VAAR) se prepara cotransfectando un plásmido que contiene el gen de interés flanqueado por las dos repeticiones terminales del VAA y/o un plásmido de expresión que contiene las secuencias codificantes del VAA natural sin las repeticiones terminales, por ejemplo pIM45. Las células también se infectan y/o transfectan con adenovirus y/o plásmidos que llevan los genes del adenovirus necesarios para la función auxiliar de VAA. Las poblaciones de virus VAAR preparadas de esta manera están contaminadas con

adenovirus, el cual se ha de separar físicamente de las partículas VAAr (por ejemplo, por centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio o cromatografía en columna). De forma alternativa, se pueden usar vectores adenovíricos que contengan las regiones codificantes del VAA y/o líneas celulares que contengan las regiones codificantes del VAA y/o algunos o todos los genes auxiliares del adenovirus. También se pueden usar líneas celulares que lleven el ADN del VAAr en forma de provirus integrado.

[0070] En la naturaleza existen múltiples serotipos del VAA, conociéndose actualmente al menos doce serotipos (VAA1-VAA12). A pesar del alto grado de homología, los diferentes serotipos muestran tropismo por tejidos diferentes. El receptor para el VAA1 es desconocido; sin embargo, se sabe que el VAA1 transduce los músculos esquelético y cardíaco con mayor eficacia que el VAA2. Puesto que la mayoría de los estudios se han realizado con vectores pseudotipados en los que el ADN del vector flanqueado por las RTI del VAA2 está empaquetado en cápsidas de distintos serotipos, está claro que las diferencias biológicas están relacionadas con la cápsida en vez de con los genomas. Evidencias recientes indican que los casetes de expresión de ADN empaquetados en cápsidas del VAA1 son al menos $1 \log_{10}$ más eficaces en la transducción de cardiomiocitos que los empaquetados en cápsidas del VAA2.

Vectores adenovíricos

[0071] Otro procedimiento de liberación del polinucleótido para la terapia génica implica el uso de un vector de expresión adenovírico. Un "vector de expresión adenovírico" incluye aquellas construcciones que contienen secuencias adenovíricas suficientes (a) para resistir el empaquetamiento de la construcción y/o (b) para expresar finalmente una construcción específica de tejido y/o de célula que se haya clonado en él.

[0072] En una forma de la invención, el vector de expresión comprende una forma genéticamente manipulada del adenovirus. El conocimiento de la organización genética del adenovirus, un virus de ADN lineal de doble hebra y 36 kb, permite sustituir grandes fragmentos de ADN adenovírico por secuencias exógenas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, Seminar in Virology, 1992; 3:237-252). A diferencia del retrovirus, la infección de células huésped por adenovirus no tiene como resultado la integración en el cromosoma, puesto que el ADN adenovírico se puede replicar de manera episómica sin genotoxicidad potencial. Asimismo, los adenovirus son estructuralmente estables y no se ha detectado ninguna reorganización genómica tras una extensa amplificación.

[0073] Los expertos en la técnica conocen el cultivo y la manipulación de los adenovirus, mostrando éstos un amplio espectro de huéspedes *in vitro* e *in vivo*. Se pueden obtener títulos elevados de este grupo de virus, por ejemplo de 10^9 a 10^{11} unidades formadoras de placas por ml, y son altamente infecciosos. El ciclo vital del adenovirus no requiere la integración en el genoma de la célula huésped. Los genes exógenos liberados por los vectores adenovíricos son episómicos y, por lo tanto, presentan una genotoxicidad baja sobre las células huésped. No se ha informado de efectos secundarios en estudios de vacunación con el adenovirus natural, lo que demuestra su seguridad y/o potencial terapéutico como vectores de transferencia génica *in vivo*.

[0074] Los vectores adenovíricos se han usado en la expresión génica en eucariotas y en el desarrollo de vacunas. Recientemente, estudios en animales han sugerido el uso de adenovirus recombinantes para la terapia génica (véase, por ejemplo, Stratford-Perricaudet y col., Hum. Gene. Ther., 1991; 1:242-256; Rich y col., 1993). Los estudios en los que se administró adenovirus recombinante a diferentes tejidos incluyen inyección muscular, inyecciones intravenosas periféricas e inoculación estereotáctica en el cerebro. El adenovirus y el virus adeno-asociado recombinantes pueden infectar y transducir células primarias humanas que no se dividen.

[0075] Aunque se contempla el uso de vectores adenovíricos, este uso en ensayos de terapia génica cardiovascular está limitado actualmente por la expresión transgénica de corta duración (Vassalli G. y col., Int. J. Cardiol., 2003; 90(2-3):229-38). Esto se debe a la inmunidad celular frente a antígenos adenovíricos. Los vectores adenovíricos "cobardes" mejorados presentan una inmunogenicidad reducida, pero siguen siendo ineficaces si para el efecto terapéutico se necesita o desea una expresión máxima del transgén durante más de seis meses (Gilbert R, y col., Hum. Mol. Genet., 2003; 12(11):1287-99). Los vectores VAA han demostrado una expresión a largo plazo (> 1 año) y constituyen el vector preferido para obtener efectos terapéuticos cuando se requiera una expresión a largo plazo (Daly TM, y col., Gene Ther., 2001; 8(17):1291-8).

Vectores retrovíricos

[0076] Los retrovirus se pueden elegir como vectores de liberación de genes debido a su capacidad para integrar sus genes en el genoma del huésped, transferir una gran cantidad de material genético exógeno, infectar un amplio espectro de especies y tipos celulares y por ser empaquetados en líneas celulares especiales.

[0077] El genoma retrovírico contiene tres genes, gag, pol y env, que codifican proteínas de la cápsida, la enzima polimerasa y componentes de la envoltura, respectivamente. Una secuencia situada en dirección 5' del gen gag contiene una señal para el empaquetamiento del genoma en los viriones. En los extremos 5' y 3' del genoma

vírico están presentes dos secuencias repetidas terminales largas (RTL). Éstas contienen secuencias promotoras y potenciadoras fuertes y también se requieren para la integración en el genoma de la célula huésped.

[0078] Para construir un vector retrovívico se inserta un ácido nucleico que codifica un gen de interés en el genoma vírico en el lugar de ciertas secuencias víricas para producir un virus defectuoso para la replicación. Con el fin de producir viriones se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol y/o env pero no las RTL y/o los componentes de empaquetamiento. Cuando se introduce en esta línea celular un plásmido recombinante que contiene un ADNc junto con las secuencias retrovívicas RTL y de empaquetamiento (por precipitación con fosfato cálcico, por ejemplo), la secuencia de empaquetamiento permite empaquetar el transcrito de ARN del plásmido recombinante en partículas víricas, las cuales se secretan después al medio de cultivo. El medio que contiene los retrovirus recombinantes se recoge, se concentra opcionalmente y se usa para la transferencia génica. Los vectores retrovívicos son capaces de infectar una amplia variedad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y la expresión estable requieren la división de las células huésped.

15 Herpesvirus

[0079] El virus del herpes simple (VHS), por ser neurotrópico, ha recibido un considerable interés en el tratamiento de trastornos del sistema nervioso. Además, la capacidad del VHS de establecer infecciones latentes en células neuronales que no se dividen sin integrarse en el cromosoma de la célula huésped ni alterar de otra manera el metabolismo de la célula huésped, junto con la existencia de un promotor que es activo durante la latencia, convierte al VHS en un vector atractivo. Y aunque se haya prestado mucha atención a las aplicaciones neurotrópicas del VHS, este vector, dado su amplio espectro de huéspedes, también se puede aprovechar para otros tejidos.

[0080] Otro factor que convierte al VHS en un vector atractivo es el tamaño y la organización del genoma. Puesto que el VHS es grande, la incorporación de múltiples genes o casetes de expresión es menos problemática que en otros sistemas víricos más pequeños. Además, la disponibilidad de diferentes secuencias controladoras víricas con rendimientos variables (temporal, fuerza, etc.) permite controlar la expresión en mayor medida que en otros sistemas. Asimismo es una ventaja que el virus presente relativamente pocos mensajes empalmados, lo que facilita adicionalmente la manipulación genética.

[0081] El VHS también es relativamente fácil de manipular, y se pueden obtener títulos elevados en cultivo. Así, la liberación no es un problema, tanto en cuanto a los volúmenes necesarios para alcanzar una multiplicidad de infección (MDI) suficiente como a la necesidad reducida de dosificaciones repetidas. Para una revisión del VHS como vector para la terapia génica véase Glorioso y col., Annu. Rev. Microbiol., 1995; 49:675-710. Se han desarrollado variantes avirulentas del VHS que se pueden adquirir fácilmente para el uso en los contextos de la terapia génica (patente de Estados Unidos nº 5,672,344).

40 Vectores lentivíricos

[0082] Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovívicos comunes gag, pol y env, contienen otros genes con funciones reguladoras o estructurales. La mayor complejidad permite al virus modular su ciclo vital, como en el curso de una infección latente. Algunos ejemplos de lentivirus incluyen los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1, VIH-2) y el virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS). Los vectores lentivíricos han sido generados por atenuación múltiple de los genes de virulencia del VIH, por ejemplo se delecionan los genes env, vif, vpr, vpu y nef, lo que hace que el vector sea biológicamente seguro.

[0083] Los vectores lentivíricos son conocidos en la técnica; véanse las patentes de Estados Unidos nº 6,013,516 y 5,994,136. En general, los vectores están basados en plásmidos o virus y están configurados para llevar las secuencias esenciales para la incorporación de ácido nucleico exógeno, la selección y la transferencia del ácido nucleico a una célula huésped. Los genes gag, pol y env de los vectores de interés también son conocidos en la técnica. Así, los genes relevantes se clonan en el vector seleccionado y después se usan para transformar la célula diana de interés.

[0084] En la patente de Estados Unidos nº 5,994,136 se describe un lentivirus recombinante capaz de infectar una célula que no se divide transfectando una célula huésped adecuada con dos o más vectores que llevan las funciones de empaquetamiento, a saber gag, pol y env, así como rev y tat. Se describe un primer vector que puede proporcionar un ácido nucleico que codifica un gen vírico gag y uno pol, y otro vector que puede proporcionar un ácido nucleico que codifica un gen vírico env para producir una célula de empaquetamiento. La introducción de un vector que proporciona un gen heterólogo en esa célula de empaquetamiento genera una célula productora que libera partículas víricas infecciosas que llevan el gen exógeno de interés. El env es preferentemente una proteína anfotrópica de la envoltura que permite la transducción de células humanas o de otras especies.

Vectores víricos de vaccinia

[0085] Los vectores víricos de vaccinia se han usado extensamente por la sencillez de su construcción, los niveles de expresión relativamente elevados que se obtienen, el amplio espectro de huéspedes y la gran capacidad para portar ADN. El virus vaccinia contiene un genoma de ADN lineal de hebra doble de aproximadamente 186 kb que muestra una marcada preferencia por "A-T". Unas repeticiones terminales invertidas de aproximadamente 10,5 kb flanquean el genoma. La mayoría de los genes esenciales parecen mapear en la región central, la cual es la más conservada entre los poxvirus. Hay entre 150 y 200 marcos abiertos de lectura estimados en el virus vaccinia. Aunque ambas hebras son codificantes, no es común un solapamiento extenso de los marcos de lectura.

[0086] En el genoma del virus vaccinia se pueden insertar al menos 25 kb. Los vectores prototípicos de vaccinia contienen transgenes insertados en el gen vírico de la timidina cinasa por recombinación homóloga. Los vectores se seleccionan en base a un fenotipo de la tk. La inclusión de la secuencia líder no traducida del virus de la encefalomiocarditis da como resultado un nivel de expresión que es mayor que el de los vectores convencionales, acumulándose los transgenes en un 10% o más respecto a las proteínas de la célula infectada en 24 h.

Vectores de poliomavirus

[0087] Las cápsidas vacías de los papovavirus, tales como el poliomavirus murino, han recibido atención como posibles vectores para la transferencia génica. El uso de poliomavirus vacíos se describió por primera vez cuando se incubaron ADN de poliomavirus y cápsidas vacías purificadas en un sistema exento de células. El ADN de la nueva partícula se protegió contra la acción de la DNasa pancreática. Las partículas reconstituidas se usaron para transferir un fragmento de ADN transformante de poliomavirus a células murinas FIII. Las cápsidas vacías y las partículas reconstituidas constaban de los tres antígenos de la cápsida del poliomavirus, VP1, VP2 y VP3. La patente de Estados Unidos nº 6,046,173 describe el uso de una pseudocápsida formada a partir del antígeno principal de la cápsida de papovavirus, excluyendo los antígenos minoritarios de la cápsida, y que incorpora material exógeno para la transferencia génica.

Otros vectores víricos

[0088] En la presente invención se pueden usar otros vectores víricos como construcciones de expresión, tales como vectores derivados de virus tales como el virus sindbis o el citomegalovirus. Ofrecen varias características atractivas para diversas células de mamífero (véanse, por ejemplo, Friedmann, Science, 1989; 244:1275-1281; Horwich y col., J. Virol., 1990; 64:642-650).

[0089] Con el reconocimiento de virus defectuosos de la hepatitis B se ha adquirido una nueva percepción de la relación estructura/ función de diferentes secuencias víricas. Estudios *in vitro* han mostrado que el virus puede retener la capacidad para el empaquetamiento dependiente de una función auxiliar y la transcripción inversa pese a la delección de hasta un 80% de su genoma (Horwich y col., J. Virol. 64:642-650 (1990)). Esto sugirió la posibilidad de sustituir grandes porciones del genoma por material genético exógeno. Chang y col. introdujeron el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) en el genoma del virus de la hepatitis R del pato en lugar de secuencias codificantes de la polimerasa, de superficie y/o de pre-superficie. Éste se cotransfectó con virus natural en una línea celular de hepatoma aviar. Los medios de cultivo que contenían altos títulos del virus recombinante se usaron para infectar hepatocitos primarios de pato. Se detectó una expresión estable del gen CAT durante al menos 24 días después de la transfección (Chang y col., Hepatology 14:134A (1991)).

Virus modificados

[0090] En aún otras realizaciones de la presente invención, los ácidos nucleicos que se han de liberar se alojan dentro de un virus infeccioso que ha sido manipulado para expresar un ligando de unión específico. Así, la partícula vírica se unirá específicamente a los receptores afines de la célula diana y liberará el contenido en la célula. Se ha desarrollado una nueva estrategia diseñada para permitir el direccionamiento específico de los vectores retrovíricos y basada en la modificación química de un retrovirus mediante la adición química de restos de lactosa a la envoltura vírica. Esta modificación puede permitir la infección específica de hepatocitos a través de receptores de sialoglicoproteínas.

[0091] Se ha diseñado otra estrategia para el direccionamiento de retrovirus recombinantes, en la que se han usado anticuerpos biotinilados contra una proteína de la envoltura retrovírica o contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron mediante los componentes de biotina usando estreptavidina. Usando anticuerpos contra los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y/o de clase II se demostró la infección de una diversidad de células humanas que llevaban aquellos antígenos de superficie con un virus ecotrópico *in vitro*.

Transferencia no vírica

[0092] Las construcciones de ADN de la presente invención se liberan generalmente en una célula. En ciertas realizaciones, sin embargo, el ácido nucleico que se ha de transferir no es infeccioso y se puede transferir usando procedimientos no víricos.

[0093] En la presente invención se contemplan varios procedimientos no víricos para la transferencia de construcciones de expresión a células de mamífero en cultivo. Los procedimientos adecuados para la liberación de ácidos nucleicos para el uso con la presente invención incluyen los procedimientos descritos en la presente memoria o los conocidos para un experto normal en la técnica. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, la liberación directa de un plásmido de ADN "desnudo" a través de la vasculatura (patente de Estados Unidos nº 6,867,196); por transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987; Wong y col., 1980; Kaneda y col., 1989; Kato y col., 1991) y transfección mediada por receptores (Wu y Wu, 1988); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaeppeler y col., 1990; patentes de Estados Unidos nº 5,302,523 y 5,464,765); el uso de lípidos catiónicos; ADN desnudo; o ADN microencapsulado (solicitud de patente de Estados Unidos nº 2005/0037085). Mediante la aplicación de técnicas como éstas se pueden transformar de forma estable o transitoria células o tejido diana.

[0094] Una vez liberada la construcción en la célula, el ácido nucleico que codifica el gen terapéutico se puede colocar y expresar en diferentes sitios. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico que codifica el gen terapéutico se puede integrar de forma estable en el genoma de la célula. Esta integración puede realizarse en el lugar y la orientación afines por recombinación homóloga (sustitución génica) o se puede integrar en un lugar aleatorio no específico (aumento génico). En aún otras realizaciones, el ácido nucleico se puede mantener estable en la célula en forma de un segmento de ADN episómico separado. Tales segmentos de ácido nucleico, o "episomas", codifican secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y la replicación independientes de o sincronizados con el ciclo celular del huésped. El modo en que la construcción de expresión se libera en una célula y el lugar en que permanece el ácido nucleico en la célula dependen del tipo de construcción de expresión usado.

[0095] En una realización concreta de la invención, la construcción de expresión se puede encerrar en un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana bicapa fosfolipídica y un medio acuoso interior. Los liposomas multilaminares presentan múltiples capas lipídicas separadas por un medio acuoso. Se forman espontáneamente cuando se suspenden fosfolípidos en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos sufren una autorreorganización antes de formar estructuras cerradas y atrapar agua y solutos disueltos entre las bicapas lipídicas. La adición de ADN a los liposomas catiónicos provoca una transición topológica de liposomas a glóbulos condensados líquido-cristalinos ópticamente birrefringentes. Estos complejos ADN/lípidos son vectores no víricos potenciales para el uso en la terapia génica.

[0096] La liberación de ácidos nucleicos mediada por liposomas y la expresión de ADN exógeno *in vitro* han tenido mucho éxito. Usando el gen de la β -lactamasa los investigadores han demostrado la viabilidad de la liberación mediada por liposomas y de la expresión de ADN exógeno en células embrionarias de pollo, HeLa y de hepatoma. También se ha conseguido con éxito la transferencia génica mediada por liposomas en ratas tras la inyección intravenosa. También se incluyen diversas estrategias comerciales que implican la tecnología de la "lipofección".

[0097] En ciertas realizaciones de la invención, el liposoma se puede complejar con un virus hemaglutinante (VHJ). Se ha demostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y fomenta la entrada del liposoma/ ADN encapsulado en la célula. En otras realizaciones, el liposoma se puede complejar o usar junto con proteínas cromosómicas nucleares distintas de histonas (HMG-1). En aún otras realizaciones, el liposoma se puede complejar o usar junto con el VHJ y la HMG-1. Tales construcciones de expresión se pueden aplicar a la presente invención siempre y cuando se hayan usado con éxito en la transferencia y expresión de ácido nucleico *in vitro* e *in vivo*.

[0098] Otros sistemas de liberación de vectores que se pueden usar para liberar un ácido nucleico que codifica un gen terapéutico en células son los vehículos de liberación mediada por receptores. Éstos aprovechan la captación selectiva de macromoléculas por endocitosis mediada por receptores en casi todas las células eucariotas. La liberación puede ser altamente específica debido a que diversos receptores se distribuyen de forma específica del tipo celular (Wu y Wu, 1993). Cuando se usan liposomas, se pueden usar otras proteínas que se unan a una proteína de membrana de la superficie celular asociada a endocitosis para dirigir y/o facilitar la captación, por ejemplo proteínas de la cápsida o fragmentos de ellas con tropismo por un tipo celular concreto, anticuerpos contra proteínas que sufran una internalización durante el ciclo y proteínas que se dirijan a localizaciones intracelulares y potencien la semivida intracelular.

[0099] Los vehículos de direccionamiento génico mediado por receptores generalmente constan de dos componentes: un ligando específico de un receptor celular y un agente de unión a ADN. Se han usado varios ligandos para la transferencia génica mediada por receptores. Los ligandos mejor caracterizados son el asialo-orosomucoide (ASOR) y la transferrina (Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. 87(9):3410-14 (1990)). Se ha usado

como vehículo de liberación génica una neoglicoproteína sintética que reconoce el mismo receptor que el ASOR. También se ha usado el factor de crecimiento epidérmico (EGF) para liberar genes en células de carcinoma escamoso.

5 **[0100]** En otras realizaciones, el vehículo de liberación puede comprender un ligando y un liposoma. Los investigadores han usado, por ejemplo, la lactosil-ceramida, un asialo-gangliósido con galactosa terminal, incorporada en liposomas y han observado un incremento en la captación del gen de la insulina por los hepatocitos. Por lo tanto, también resulta factible que un ácido nucleico que codifica un gen terapéutico se pueda liberar
10 específicamente en un tipo celular, como en células cardíacas, mediante cualquier número de sistemas receptor/ligando, con o sin liposomas.

[0101] En otra realización de la invención, la construcción de expresión se puede componer simplemente de ADN recombinante desnudo o plásmidos. La transferencia de la construcción se puede efectuar mediante cualquiera de los procedimientos antes mencionados que permeabilicen física o químicamente la membrana celular. Esto se aplica, en particular, a la transferencia *in vitro*, aunque también se puede aplicar al uso *in vivo*. Se prevé que el ADN terapéutico también se pueda transferir de manera similar *in vivo*. Wolff y col. (patente de Estados Unidos nº 6,867,196) enseña que se puede obtener una transferencia génica eficaz en tejido cardíaco mediante la inyección de soluciones de ADN plasmídico en una vena o arteria del corazón. Wolff expone asimismo la administración de ARN, ADN no plasmídico y vectores víricos.

20 **[0102]** Los vectores útiles en la presente invención poseen eficacias de transducción variables. En consecuencia, el vector vírico o no vírico transduce más de, igual a o al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 100% de las células de la región vascular diana. Se puede usar más de un vector (vírico o no vírico, o una combinación de ellos) simultánea o sucesivamente. Se puede usar para transferir más de un polinucleótido y/o dirigirse a más de un tipo celular. Cuando se usan múltiples vectores o múltiples agentes, se puede obtener más de una eficacia de transducción/ transfección.

Sustancias terapéuticas

30 **[0103]** Las sustancias terapéuticas, incluidos los polinucleótidos, que son útiles en la presente invención se usan para tratar enfermedades cardiovasculares. Estas sustancias incluyen compuestos conocidos para el tratamiento de cualquier aspecto de las enfermedades cardiovasculares. El polinucleótido puede dirigirse a cualquier ácido nucleico o proteína conocido del sistema cardiovascular, dando lugar a la modulación de una actividad celular del tejido cardíaco. Son de especial interés los ácidos nucleicos y las proteínas necesarias para la contracción del miocardio, incluidos los ácidos nucleicos y las proteínas que regulan las concentraciones de calcio en el miocardio.

40 **[0104]** Cada contracción muscular requiere la entrada de Ca^{2+} en el citoplasma de las células musculares, mientras que la relajación requiere la eliminación del Ca^{2+} activador, lo que hace que la regulación de la contracción por Ca^{2+} sea una de las actividades más importantes en el cuerpo humano. No es sorprendente, pues, que las proteínas implicadas en la regulación del Ca^{2+} puedan causar, cuando están mutadas, una diversidad de cardiomiopatías y enfermedades musculoesqueléticas relacionadas con defectos en la regulación del Ca^{2+} .

45 **[0105]** Las Ca-ATPasas del retículo sarcoplasmático (SERCA) bombean calcio desde el citoplasma de las células de mamífero hacia estructuras organulares tales como el retículo sarcoplasmático en el músculo o el retículo endoplasmático en células no musculares. Su umbral de activación por calcio es del orden de 100 a 200 nM, de manera que fijan el nivel de calcio citoplasmático en reposo. Un ciclo de calcio anormal, característico de la insuficiencia cardíaca experimental y humana, está asociado con una actividad de captación de calcio deteriorada en el retículo sarcoplasmático.

50 **[0106]** La SERCA2a, la isoforma cardíaca/de contracción lenta, se une a y es regulada por fosfolamban (PLN), una proteína homopentamérica de 52 aminoácidos formada por tres dominios. Durante la contracción muscular el fosfolamban inhibe la bomba de Ca^{2+} . Durante la relajación muscular se puede fosforilar, lo que elimina la inhibición y permite bombear el Ca^{2+} de vuelta al retículo sarcoplasmático. Se piensa que la regulación se produce en primer lugar por una interacción física entre el monómero de fosfolamban y la bomba. Sin embargo, el péptido de 52 restos también se asocia en pentámeros, que han demostrado ser selectivos de iones Ca^{2+} .

60 **[0107]** Una actividad de captación de calcio deteriorada en el retículo sarcoplasmático refleja disminuciones en la ruta de señalización mediada por AMPc e incrementos en la actividad de la fosfatasa de tipo 1. La actividad aumentada de la proteína fosfatasa 1 se debe en parte a la desfosforilación e inactivación de su inhibidor-1, lo que provoca la desfosforilación de fosfolamban y la inhibición de la bomba de calcio del retículo sarcoplasmático. De hecho, la expresión cardioespecífica de un inhibidor-1 activo de forma constitutiva tiene como resultado una potenciación selectiva de la fosforilación de fosfolamban y un aumento en la contractilidad cardíaca a los niveles celular y del animal intacto. En particular, la liberación génica adenovírica aguda del inhibidor-1 activo restablece por

completo la función e invierte parcialmente el remodelado, que incluye la normalización de la p38 hiperactivada, en el ámbito de una insuficiencia cardiaca preexistente (Pathak y col. *Circ. Res.*, 2005; 96(7):756-66).

5 **[0108]** Las arritmias ventriculares pueden causar la muerte súbita cardiaca (MSC) en pacientes con corazones normales y en aquellos que presentan una enfermedad subyacente, tal como una insuficiencia cardiaca. En animales con insuficiencia cardiaca y en pacientes con formas hereditarias de MSC inducida por ejercicio, la depleción de la proteína estabilizadora del canal calstabilina 2 (FKBP12.6) del complejo receptor de rianodina/ canal de liberación de calcio (RyR2) provoca una pérdida de Ca^{2+} intracelular que puede disparar arritmias cardiacas fatales. Unos niveles más altos de calstabilina 2 estabilizan el estado cerrado de RyR2 y evitan la pérdida de Ca^{2+} que dispara las arritmias. Por lo tanto, se piensa que la potenciación de la unión de calstabilina 2 a RyR2 constituye una estrategia terapéutica para las arritmias ventriculares comunes.

15 **[0109]** Los ácidos nucleicos y proteínas de la SERCA, el fosfolamban, el inhibidor-1 de la fosfatasa de tipo I, S100A1 y la sarcolipina, así como los ácidos nucleicos y proteínas relacionados que desempeñan un papel en el ciclo del Ca^{2+} , son dianas preferidas para los polinucleótidos de la presente invención.

20 **[0110]** Un vector vírico y transgén preferido es el VAA2/1/SERCA2a, que se compone de una cápsida vírica del serotipo 1 del VAA que incluye un ADN de hebra sencilla de 4.486 nucleótidos que contiene el casete de expresión de la SERCA2a humana flanqueado por RTI derivadas del serotipo 2 del VAA. La cápsida icosaédrica consta de tres proteínas relacionadas de la cápsida del serotipo 1 del VAA, VP1, VP2 y VP3. El ADN de VAA2/1/SERCA2a contiene los siguientes componentes: RTI basadas en el serotipo 2 del VAA en los extremos 3' y 5' que flanquean el casete de expresión CMV-hSERCA2a-poliA. El casete de expresión contiene el potenciador/promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV_{it}), que dirige la transcripción de las secuencias que incluyen un intrón híbrido del plásmido comercial pCI (Promega - GenBank U47119), el ADNc de la hSERCA2a (secuencia codificante idéntica a GenBank NM-001681) y una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina [BGHpA, (GenBank M57764)]. El intrón híbrido se diseñó usando el sitio donador 5' del primer intrón de la β -globulina humana y el sitio receptor 3' del intrón situado entre el líder y el cuerpo de una región variable de la cadena pesada del gen de inmunoglobulina (véase la figura 1).

30 **[0111]** El vector VAA2/1/SERCA2a incorpora menos de 300 nucleótidos de las secuencias del VAA natural (VAAn) en el genoma del vector. Las secuencias del VAAn son RTI derivadas del serotipo 2 del VAA que proporcionan la señal de empaquetamiento en *cis* (figura 2), que permite la inserción del ADN de la SERCA2a en la cápsida.

35 **[0112]** Sin estar vinculado a ningún mecanismo de acción concreto, se cree que los niveles proteicos de la SERCA2a están reducidos en los cardiomiocitos de los pacientes con ICC, y que el aumento de los niveles de esta proteína en los cardiomiocitos normalizará los niveles diastólicos anormalmente elevados del calcio citosólico típicos de la ICC y mejorará los resultados clínicos.

40 **[0113]** Los agentes terapéuticos, incluidos los polinucleótidos y los polinucleótidos en combinación con un vector tanto vírico como no vírico, como se ha comentado anteriormente, se pueden usar en la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares cuando el medicamento se administra por infusión directa en la circulación coronaria.

45 Efecto terapéutico

50 **[0114]** En una realización preferida, la infusión de los agentes terapéuticos descritos en la presente memoria se usa para lograr un efecto terapéutico en un paciente que sufre una cardiopatía. El individuo tratado se puede monitorizar en cuanto a las características clínicas que acompañan la cardiopatía. Por ejemplo, los sujetos se pueden monitorizar en cuanto a la reducción de las señales y síntomas adversos asociados a las enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, después de tratar la insuficiencia cardiaca congestiva en un sujeto usando los procedimientos de la presente invención, el sujeto se puede evaluar en cuanto a mejoras en una serie de parámetros clínicos, que incluyen, pero no se limitan a, una mayor fracción de acortamiento del ventrículo lateral; una mayor contractilidad cardiaca a los niveles celular y de animal intacto, la inversión del remodelado cardiaco y la normalización de los niveles diastólicos anormalmente elevados del calcio citosólico. Otras características clínicas que se pueden monitorizar en un sujeto tratado con la presente invención incluyen, sin limitación, la supervivencia, el metabolismo cardiaco, la contractilidad cardiaca, la frecuencia cardiaca, la función ventricular (por ejemplo, la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI), la presión sistólica del ventrículo izquierdo (PSVI)), el metabolismo del Ca^{2+} (por ejemplo, la concentración intracelular de Ca^{2+} , la $[\text{Ca}^{2+}]$ máxima o en reposo, la actividad Ca^{2+} -ATPasa del RS, el estado de fosforilación de fosfolamban), la generación de fuerza, la relajación y presión del corazón, la relación fuerza/frecuencia, la supervivencia o apoptosis de cardiocitos o la actividad de los canales iónicos (por ejemplo, intercambiadores de sodio/calcio, actividad de los canales de sodio, actividad de los canales de calcio, actividad de la bomba ATPasa de sodio/potasio), la actividad de la cadena pesada de miosina, troponina I, troponina C, troponina T, tropomiosina, actina, miosina cinasa de cadena ligera, cadena ligera 1 de miosina, cadena

ligera 2 de miosina o cadena ligera 3 de miosina, receptor de IGF-1, PI3-quinasa, AKT-quinasa, intercambiador de sodio/calcio, canal de calcio (L y T), calsecuestrina o calreticulina. La evaluación se puede realizar antes, después o durante el tratamiento. Otros parámetros de una cardiopatía que se pueden monitorizar incluyen la fracción de acortamiento, el gasto cardíaco, la fracción de eyección, tau, el volumen de regurgitación, el número de estancias en hospital, la calidad de vida y el tiempo de esfuerzo.

[0115] Los procedimientos y agentes terapéuticos descritos en la presente memoria se pueden combinar con tratamientos existentes para las cardiopatías, como fármacos o intervención quirúrgica, para proporcionar un efecto terapéutico incrementado en comparación con los tratamientos existentes solos. El efecto terapéutico incrementado se puede demostrar, por ejemplo, mediante una prolongación del periodo de tiempo transcurrido entre el empeoramiento de las señales o síntomas de la enfermedad en comparación con el periodo de tiempo medio o típico para los regímenes terapéuticos existentes, o mediante una prolongación del tiempo necesario hasta que se requiera un tratamiento adicional en comparación con el tiempo medio o típico para el tratamiento convencional solo.

[0116] En los siguientes ejemplos no limitantes se describirán ahora con más detalle las realizaciones de la invención.

Ejemplo 1: Efecto del tiempo de infusión en la biodistribución de VAA2/1/SERCA2a a corto plazo en cerdos enanos normales

[0117] Se realizó un estudio para evaluar la transducción del miocardio cuantificando el ADN específico del vector tras una infusión coronaria epicárdica anterógrada de VAA2/1/SERCA2a en cerdos enanos normales.

Grupos

[0118] El grupo control (un animal) de este estudio fue un control sin tratamiento. Este animal se sometió a los mismos procedimientos que los otros grupos, excepto a la administración de VAA2/1/SERCA2a. Se administraron a los animales experimentales 1×10^{12} PRD de VAA2/1/SERCA2a en la arteria coronaria izquierda mediante un catéter de infusión para arteria coronaria usando una bomba de jeringa (5 animales en los grupos 3 a 5) o por inyección intramuscular (IM) directa (un único animal en el grupo 2). Los grupos recibieron el VAA2/1/SERCA2a a dos concentraciones de vector y a velocidades de infusión variables. En todos los grupos que recibieron el vector se lavó con solo sangre el volumen muerto del tubo y del catéter después de la administración del vector. Los animales eran Gottingen Minipig, tenían al menos cuatro meses de edad y pesaban entre 8 y 12 kg. Los animales se asignaron a uno de los cinco grupos, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Designación de los grupos

Concentración/tiempo de infusión en grupos de tratamiento	Dosis total (PRD)	Nº/grupo	Tiempo de infusión del vector (min)
Grupo 1: Control sin tratamiento	n.p.	1	n.p.
Grupo 2: Inyección IM directa	1×10^{12}	1	n.p.
Grupo 3: Inyección en bolo (~0,5 min)	1×10^{12}	1	0,5
Grupo 4: Infusión de 10 minutos	1×10^{12}	3	10
Grupo 5: Infusión de 15 minutos	1×10^{12}	1	15

Anestesia / Muestra de sangre

[0119] Los animales se anestesiaron el día 0 usando procedimientos convencionales. De forma profiláctica se administró un antibiótico en el músculo de una pata trasera. Se monitorizaron los signos vitales (frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria y O_2 mediante el oxímetro de pulso). Se obtuvo un ECG para fines de seguimiento.

Administración de VAA2/1/SERCA2a

Administración de VAA2/1/SERCA2a por inyección IM directa: Grupo 2

[0120] El día 0 se usaron una jeringa y una aguja intramusculares convencionales para inyectar el VAA2/1/SERCA2a en el cuadrante muscular posterior. El volumen y la concentración administrados se muestran en la tabla 2 más adelante. El VAA2/1/SERCA2a se almacenó congelado a una temperatura de $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ o menor hasta su uso. El día de uso, el VAA2/1/SERCA2a se descongeló a temperatura ambiente y se mantuvo en hielo hasta que el animal estuvo listo para la administración. Tras mezclarlo con cuidado por inversión se transfirieron de forma aséptica 0,72 ml de la solución madre de VAA2/1/SERCA2a a $1,4 \times 10^{12}$ PRD/ml a una jeringa y aguja intramusculares convencionales. La administración única de una dosis total de 1×10^{12} PRD de VAA2/1/SERCA2a se realizó por inyección intramuscular en el cuadrante muscular posterior.

Procedimientos generales: Administración de VAA2/1/SERCA2a por infusión coronaria epicárdica anterógrada (grupos 3-5)

5 **[0121]** El sistema de infusión directa consta de componentes convencionales (disponibles en el mercado) que incluyen una vaina guía convencional, un alambre guía de 0,014", un catéter (guía) de infusión 5F y dos bombas de jeringa programables. Un aspecto importante de este procedimiento son los tiempos de infusión usados para la administración del vector. Los volúmenes exactos pueden variar en base a las concentraciones iniciales del vector, los volúmenes muertos de la unidades de tubo y catéter, etc.

10 **[0122]** El día 0 se inició el procedimiento de infusión directa con la introducción de la vaina guía usando un abordaje de la arteria femoral. A continuación se colocó un catéter de infusión coronaria (por ejemplo, un catéter guía Vista Brite Tip de Cordis o un modelo similar apropiado para la canulación de la arteria coronaria principal izquierda) en la arteria coronaria principal izquierda bajo guiado fluoroscópico. Una vez colocado el catéter, éste se conectó a la primera bomba de jeringa programable (por ejemplo, una bomba de jeringa programable NE-1000, New Era Pump Systems) usando tubos y técnicas de purga convencionales. Después se liberó el VAA2/1/SERCA2a y a continuación se lavó el volumen muerto del catéter con solo sangre mediante una segunda bomba de jeringa programable. En las tablas 3 y 4 se muestra una lista detallada de los materiales y pasos de procedimiento necesarios para el procedimiento de infusión directa. En la tabla 2 se muestran los volúmenes de dilución, los tiempos de infusión, las velocidades de infusión, el volumen liberado antes del lavado con solo sangre y los tiempos requeridos para completar el lavado con solo sangre.

Grupo 3: Administración de VAA2/1/SERCA2a (inyección en bolo)

25 **[0123]** Tras un mezclado suave por inversión se transfirieron de forma aséptica 0,72 ml de la solución madre de VAA2/1/SERCA2a a $1,4 \times 10^{12}$ PRD/ml y 1,3 ml de tampón de formulación (NaCl 130 mM, HEPES 20 mM y MgCl₂ 1 mM a pH 7,4) a un recipiente de polipropileno estéril, obteniéndose una concentración de $5,0 \times 10^{11}$ PRD/ml. Justo antes de la administración al animal se llevaron 2,0 ml del VAA2/1/SERCA2a diluido (5×10^{11} PRD/ml) a temperatura ambiente y se mezclaron con 1,0 ml de sangre nativa completa del animal que iba a recibir la dosis, obteniéndose una dilución final en la jeringa de $3,3 \times 10^{11}$ PRD/ml en un volumen final de 3,0 ml. El circuito se impregnó con sangre y después se inyectó el vector en la arteria coronaria principal izquierda durante un periodo de 0,5 minutos. Siguió el lavado del volumen muerto del catéter con solo sangre.

Grupo 4: Administración de VAA2/1/SERCA2a (infusión del vector durante 10 minutos)

35 **[0124]** Tras un mezclado suave por inversión se transfirieron de forma aséptica 0,72 ml de la solución madre de VAA2/1/SERCA2a a $1,4 \times 10^{12}$ PRD/ml y 7,3 ml de tampón de formulación a un recipiente de polipropileno estéril, obteniéndose una concentración de $1,25 \times 10^{11}$ PRD/ml. Justo antes de la administración al animal se llevaron 8,0 ml del VAA2/1/SERCA2a diluido ($1,25 \times 10^{11}$ PRD/ml) a temperatura ambiente y se mezclaron con 4,0 ml de sangre nativa completa del animal que iba a recibir la dosis. El circuito de infusión se impregnó con sangre y después se liberó el vector en la arteria coronaria principal izquierda durante un periodo de 10 minutos usando una bomba de jeringa programable, a lo que siguió el lavado del volumen muerto del catéter con solo sangre mediante una segunda bomba de jeringa programable.

Grupo 5: Administración de VAA2/1/SERCA2a (infusión del vector durante 15 minutos)

45 **[0125]** Tras un mezclado suave por inversión se transfirieron de forma aséptica 0,72 ml de la solución madre de VAA2/1/SERCA2a a $1,4 \times 10^{12}$ PRD/ml y 1,3 ml de tampón de formulación a un recipiente de polipropileno estéril, obteniéndose una concentración de $5,0 \times 10^{11}$ PRD/ml. Justo antes de la administración al animal se llevaron 2,0 ml del VAA2/1/SERCA2a diluido (5×10^{11} PRD/ml) a temperatura ambiente y se mezclaron con 1,0 ml de sangre nativa completa del animal que iba a recibir la dosis. El circuito de infusión se impregnó con sangre y después se liberó el vector en la arteria coronaria principal izquierda durante un periodo de 15 minutos usando una bomba de jeringa programable, a lo que siguió el lavado del volumen muerto del catéter con solo sangre mediante una segunda bomba de jeringa programable.

Tabla 2: Esquema de dilución/administración

Concentración/ tiempo de infusión en grupos de tratamiento	Dosis total (PRD)	Volumen del vector diluido (ml)	Volumen de sangre (ml)	Volumen total de vector + sangre administrado (ml)	Tiempo de infusión del vector (min)	Velocidad de infusión (ml/min)	Tiempo de lavado con solo sangre (min)
<i>Grupo 1:</i> Control sin tratamiento	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
<i>Grupo 2:</i> Inyección IM directa	1×10^{12}	0	0	0,72	n.p.	n.p.	n.p.
<i>Grupo 3:</i> Inyección en bolo (~0,5 min)	1×10^{12}	2,0	1,0	3,0	0,5	6,0	1
<i>Grupo 4:</i> Infusión de 10 minutos	1×10^{12}	8,0	4,0	12,0	10	1,2	2
<i>Grupo 5:</i> Infusión de 15 minutos	1×10^{12}	2,0	1,0	3,0	15	0,2	10

Tabla 3: Materiales para el procedimiento de infusión directa

Cantidad	Material
1	Un catéter guía convencional (5F) con una forma apropiada
Según sea necesario	Cualquier válvula hemostática, llave de tres vías o cualquier otro accesorio usado en procedimientos cardiacos intervencionistas
1	Alambre guía de 0,014" x 175 cm (longitud mínima) (opcional)
1	Introduccion de alambre (opcional)
2	Bomba de jeringa programable (bomba de jeringa programable NE-1000, New Era Pump Systems)
2-3	Jeringas de 10-20 cc

Tabla 4: Pasos de procedimiento para el procedimiento de infusión directa

Paso	Procedimiento
1	Antes de usar el sistema de infusión directa, retirar con cuidado los componentes de sus envoltorios e inspeccionarlos en cuanto a pliegues, torsiones y otros daños. No usarlo en caso de observar algún defecto.
2	Preparar el punto de acceso arterial según la práctica intervencionista convencional.
3	Obtener acceso arterial colocando una vaina introductora convencional.
4	Introducir un catéter guía convencional en la arteria coronaria principal izquierda bajo guiado fluoroscópico y siguiendo procedimientos cardíacos intervencionistas convencionales (usar una forma de catéter apropiada para la anatomía vascular específica).
5	Administrar heparina según los procedimientos institucionales.
6	Preparar la primera bomba de jeringa programable para la liberación de VAA2/1/SERCA2a.
7	Impregnar el tubo con sangre nativa del animal que vaya a recibir la dosis y purgar todo el aire fuera del tubo.
8	Conectar el extremo distal del tubo a la válvula hemostática en el catéter guía (de infusión). Asegurar que se ha eliminado todo el aire del tubo.
9	Conectar el extremo proximal del tubo a la jeringa cargada con VAA2/1/SERCA2a.
10	Colocar la jeringa cargada con VAA2/1/SERCA2a en la bomba de jeringa.
11	Poner en marcha la primera bomba pre-programada y hacerla funcionar durante el periodo de tiempo especificado en el protocolo.
12	Preparar una segunda bomba de jeringa programable e impregnar el tubo con sangre nativa del animal que vaya a recibir la dosis y purgar todo el aire fuera del tubo.
13	Liberar el VAA2/1/SERCA2a a la velocidad de flujo especificada en el protocolo del estudio.
14	Una vez completado el periodo de liberación, detener la primera bomba de jeringa y desconectar el extremo proximal del tubo.
15	Conectar inmediatamente el extremo proximal del tubo a la segunda bomba de jeringa rellena de sangre nativa del animal que ha recibido la dosis.
16	Poner en marcha de nuevo la segunda bomba de jeringa (a la misma velocidad de flujo usada para liberar el VAA2/1/SERCA2a) e infundir la sangre.
17	Una vez completado el lavado del volumen muerto del catéter, detener la bomba de jeringa.
18	Girar la llave en la válvula hemostática a la posición de apagado y desconectar el tubo.
19	Retirar el catéter guía (de infusión) según procedimientos convencionales.
20	Desechar el tubo y las jeringas según los procedimientos institucionales.

Día 2: Sacrificio terminal y muestras de tejido para PCR

5 [0126] Tras la administración de anestesia se extrajeron muestras de sangre para la química clínica. Después, los animales se eutanizaron por administración intravenosa de 30 mg/kg de cloruro potásico y, usando técnicas convencionales, se recogieron muestras de tejido para PCR de las siguientes áreas del corazón, como se ilustra en la figura 3: pared anterior, pared posterior, tabique y pared libre en las capas basal y media del ventrículo izquierdo; pared anterior y pared posterior en la capa apical del ventrículo izquierdo; y pared libre de la capa basal y las capas apicales del ventrículo derecho.

Análisis de las muestras por PCR

15 [0127] Se usó un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCRc) para detectar y cuantificar el VAA2/1/SERCA2a en las muestras de tejido recogidas. El ensayo de PCRc detecta una secuencia de 107 pares de bases única de VAA2/1/SERCA2a usando el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700. Los cebadores para la PCRc abarcan los exones 14 y 15, como se indica en el diagrama de la figura 4. El número de copias de VAA2/1/SERCA2a detectado en un microgramo de ADN genómico extraído de cada muestra de tejido se cuantificó usando diluciones seriadas de un plásmido que contenía las secuencias diana (pcDNA3.1_huSERCA2) como patrones. El límite inferior de detección del ensayo era de 20 copias de VAA2/1/SERCA2a/μg de ADN; el límite inferior de cuantificación ascendió a 200 copias/μg de ADN.

Resultados

25 [0128] Los resultados del experimento se representan en la figura 5, que muestra las copias de VAA2/1/SERCA2a/μg de ADN junto con la cantidad relativa expresada en porcentaje del nivel alcanzado después de una inyección en bolo (30 s, grupo 3). Se hizo la media de los valores de las doce muestras de corazón diferentes (figura 3) para obtener un solo valor para cada animal, y los valores se indican por animal. En comparación con una inyección en bolo (0,5 min), un tiempo de infusión de 10 minutos incrementó el número de copias como media en un

51,6% (32%-69%), y un tiempo de infusión de 15 minutos incrementó el número de copias en un 76% respecto a la inyección en bolo. Los solicitantes señalan que aunque la inyección IM directa dio lugar a un número sustancial de copias, esto es el resultado del sacrificio de los animales el día 2 y del aclaramiento inicial del vector VAA por el sistema reticuloendotelial (monocitos/ macrófagos) (Brain J.D., y col., Am J Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 1999; 276:146-154). La inyección IM de vectores VAA1 no produce una transducción significativa del corazón a largo plazo (Rip J, y col., Hum. Gene Ther., 2005; 16(11):1276-86). Por el contrario, la infusión coronaria epicárdica anterógrada da lugar a una transducción estable del tejido, como se demuestra en el ejemplo 3. Estos resultados demuestran que unos tiempos de infusión prolongados proporcionan más copias de VAA2/1/SERCA2a por μg de ADN aunque se administre la misma cantidad de VAA2/1/SERCA2a (1×10^{12} PRD) en cada grupo.

Ejemplo 2: Efecto de la dosis de vector y de la ruta de administración en la biodistribución de VAA2/1/SERCA2a a corto plazo en ovejas

[0129] Se realizó un estudio piloto para evaluar la biodistribución a corto plazo de tres dosis diferentes de VAA2/1/SERCA2a dos días después de una administración única por infusión en la arteria coronaria izquierda en comparación con una inyección intravenosa en ovejas normales.

Grupos

[0130] Un animal recibió 1×10^{13} PRD de VAA2/1/SERCA2a infundidas mediante un catéter arterial intracoronario en la arteria coronaria izquierda usando una bomba de jeringa programable. Un segundo grupo de tres animales recibió 3×10^{12} PRD de VAA2/1/SERCA2a y un tercer grupo de dos animales recibió 1×10^{12} PRD de VAA2/1/SERCA2a, todas ellas infundidas mediante un catéter arterial intracoronario en la arteria coronaria izquierda usando una bomba de jeringa programable. Todos los grupos de infusión recibieron el VAA2/1/SERCA2a en un plazo de 8 minutos a una velocidad de flujo constante de 2,5 ml/min y, seguidamente, un lavado de 2 minutos con un volumen de catéter de solo sangre. A un único animal en un grupo control se administraron 1×10^{12} PRD de VAA2/1/SERCA2a en una inyección intravenosa de 2 ml. Los grupos se muestran a continuación en la tabla 5, y el esquema de administración se muestra en la tabla 6.

Tabla 5: Designación de los grupos

GRUPO DE TRATAMIENTO	TOTAL	DOSIS
GRUPO 1- VAA2/1/SERCA2A POR INFUSIÓN EN LA ARTERIA CORONARIA IZQUIERDA MEDIANTE UNA BOMBA DE JERINGA	3	1×10^{13} PRD
GRUPO 2 - VAA2/1/SERCA2A POR INFUSIÓN EN LA ARTERIA CORONARIA IZQUIERDA MEDIANTE UNA BOMBA DE JERINGA	3	3×10^{12} PRD
GRUPO 3 - VAA2/1/SERCA2A POR INFUSIÓN EN LA ARTERIA CORONARIA IZQUIERDA MEDIANTE UNA BOMBA DE JERINGA	2	1×10^{12} PRD
GRUPO 4 - VAA2/1/SERCA2A POR INYECCIÓN INTRAVENOSA	1	1×10^{12} PRD

Tabla 6: Esquema de dilución/administración

Concentración/ ruta de administración en grupos de tratamiento	Dosis total (PRD)	Volumen del vector diluido (ml)	Volumen de sangre (ml)	Volumen total de vector + sangre administrado (ml)	Tiempo de infusión/ inyección del vector (min)	Velocidad de infusión (ml/min)	Tiempo de lavado con solo sangre (min)
Grupo 1: Infusión intracoronaria de 1×10^{13} PRD	1×10^{13}	10	10	20	8	2,5	2
Grupo 2: Infusión intracoronaria de 3×10^{12} PRD	3×10^{12}	10	10	20	8	2,5	2
Grupo 3: Infusión intracoronaria de 1×10^{12} PRD	1×10^{12}	10	10	20	8	2,5	2
Grupo 4: Inyección i.v. de 1×10^{12} PRD	1×10^{12}	2,0	n.p.	n.p.	~0,5	n.p.	n.p.

5 Administración de VAA2/1/SERCA2a

Procedimientos generales: Administración de VAA2/1/SERCA2a por infusión coronaria epicárdica anterógrada (grupos 1 a 3)

10 **[0131]** El día 0 se administró a todos los animales una dosis completa de heparina para obtener un TCA > 300. Se usó un catéter de infusión de arteria coronaria para infundir el VAA2/1/SERCA2a en la arteria coronaria izquierda usando una bomba de jeringa programable. Los materiales y procedimientos para el implante del catéter se describen en detalle en el ejemplo 1 y en las tablas 3 y 4 anteriores. Se siguió esencialmente el mismo procedimiento.

15 Grupo 1: Administración de $1,0 \times 10^{13}$ VAA2/1/SERCA2a (infusión del vector durante 8 minutos)

20 **[0132]** Tras un mezclado suave por inversión se transfirió de forma aséptica solución madre de VAA2/1/SERCA2a a un tubo de polipropileno estéril y se diluyó con tampón de formulación (NaCl 130 mM, HEPES 20 mM y $MgCl_2$ 1 mM a pH 7,4) a un volumen total de 10 ml, obteniéndose una concentración de 1×10^{12} PRD/ml. Justo antes de la administración al animal se llevaron 10 ml del VAA2/1/SERCA2a diluido (1×10^{12} PRD/ml) a temperatura ambiente y se mezclaron con 10 ml de sangre nativa completa del animal que iba a recibir la dosis, obteniéndose un volumen final de 20,0 ml. El circuito de infusión se impregnó con sangre y después se liberó el vector en la arteria coronaria principal izquierda durante un periodo de 8 minutos a una velocidad constante de 2,5 ml/min usando una bomba de jeringa programable, a lo que siguió el lavado del volumen muerto del catéter con solo sangre mediante una segunda bomba de jeringa programable.

25 Grupo 2: Administración de $3,0 \times 10^{12}$ VAA2/1/SERCA2a (infusión del vector durante 8 minutos)

30 **[0133]** Tras un mezclado suave por inversión se transfirió de forma aséptica solución madre de VAA2/1/SERCA2a a un tubo de polipropileno estéril y se diluyó con tampón de formulación (NaCl 130 mM, HEPES 20 mM y $MgCl_2$ 1 mM a pH 7,4) a un volumen total de 10 ml, obteniéndose una concentración de 3×10^{11} PRD/ml. Justo antes de la administración al animal se llevaron 10 ml del VAA2/1/SERCA2a diluido (3×10^{11} PRD/ml) a temperatura ambiente y se mezclaron con 10 ml de sangre nativa completa del animal que iba a recibir la dosis, obteniéndose un volumen final de 20,0 ml. El circuito de infusión se impregnó con sangre y después se liberó el vector en la arteria coronaria principal izquierda durante un periodo de 8 minutos a una velocidad constante de 2,5 ml/min usando una bomba de jeringa programable, a lo que siguió el lavado del volumen muerto del catéter con solo sangre mediante una segunda bomba de jeringa programable.

35 Grupo 3: Administración de $1,0 \times 10^{12}$ VAA2/1/SERCA2a (infusión del vector durante 8 minutos)

40 **[0134]** Tras un mezclado suave por inversión se transfirió de forma aséptica solución madre de VAA2/1/SERCA2a a un tubo de polipropileno estéril y se diluyó con tampón de formulación (NaCl 130 mM, HEPES 20 mM y $MgCl_2$ 1 mM a pH 7,4) a un volumen total de 10 ml, obteniéndose una concentración de 1×10^{11} PRD/ml. Justo antes de la administración al animal se llevaron 10 ml del VAA2/1/SERCA2a diluido (1×10^{11} PRD/ml) a temperatura ambiente y se mezclaron con 10 ml de sangre nativa completa del animal que iba a recibir la dosis, obteniéndose una dilución final en la jeringa de $0,5 \times 10^{11}$ PRD/ml en un volumen final de 20,0 ml. El circuito de infusión se impregnó con sangre y después se liberó el vector en la arteria coronaria principal izquierda durante un periodo de 8 minutos a una velocidad constante de 2,5 ml/min usando una bomba de jeringa programable, a lo que

siguió el lavado del volumen muerto del catéter con solo sangre mediante una segunda bomba de jeringa programable.

Grupo 4: Administración de $1,0 \times 10^{12}$ VAA2/1/SERCA2a (inyección i.v.)

[0135] Tras un mezclado suave por inversión se transfirió de forma aséptica solución madre de VAA2/1/SERCA2a a un tubo de polipropileno estéril y se diluyó con tampón de formulación (NaCl 130 mM, HEPES 20 mM y $MgCl_2$ 1 mM a pH 7,4) a un volumen total de 2,0 ml, obteniéndose una concentración de 1×10^{12} PRD/ml. La solución se administró por inyección intravenosa (~0,5 min) usando una jeringa y una aguja i.v. convencionales.

Día 2: Sacrificio terminal y muestras de tejido para PCR

[0136] Tras la administración de anestesia los animales se eutanizaron por administración intravenosa de 30 mg/kg de cloruro potásico y se recogieron muestras de tejido para PCR usando técnicas convencionales. Se recogieron muestras de las siguientes áreas del corazón: pared anterior del ventrículo izquierdo, pared inferior del ventrículo izquierdo, tabique interventricular y pared libre del ventrículo derecho.

Análisis de las muestras por PCR

[0137] Se usó el ensayo de PCR cuantitativa descrito en el ejemplo 1 para detectar y cuantificar el VAA2/1/SERCA2a en las muestras de tejido recogidas.

Resultados

[0138] Los resultados del experimento se representan en la figura 6, en la que se muestran para cada animal las copias de VAA2/1/SERCA2a/ μ g de ADN en cada muestra de tejido cardiaco. A diferencia de la inyección intravenosa (~0,5 min), la cual dio como resultado niveles muy bajos y no cuantificables (20 a 200 copias) de VAA2/1/SERCA2a, el tiempo de infusión de 8 minutos proporcionó un número significativo de copias a las concentraciones de 1×10^{12} , 3×10^{12} y 1×10^{13} . La figura 6 muestra que una dosis total de 1×10^{13} PRD proporciona un mayor número de copias que una dosis total de 3×10^{12} PRD, la cual a su vez proporciona un mayor número de copias que una dosis total de 1×10^{12} PRD. Cabe destacar que se encontraron copias de VAA2/1/SERCA2a en las muestras del ventrículo derecho aunque el vector se administrara solo a la arteria coronaria izquierda.

Ejemplo 3: Modelo de insuficiencia cardiaca en cerdos creado por regurgitación de la válvula mitral

[0139] Se realizó un estudio piloto para evaluar el efecto de una administración única de VAA2/1/SERCA2a sobre la función cardiaca en comparación con un control de vehículo en un modelo porcino de insuficiencia cardiaca creado por regurgitación grave de la válvula mitral (RM). La regurgitación mitral (RM), conocida también como insuficiencia mitral, es una pérdida anormal de sangre a través de la válvula mitral desde el ventrículo izquierdo hacia la aurícula izquierda del corazón. El volumen de regurgitación, una medida de la gravedad de la RM, es el volumen de sangre que regurgita hacia la aurícula izquierda.

Grupos

[0140] En el estudio se usaron cerdos Yorkshire-Landrace de 3 meses de edad y de 30 a 40 kg de peso. El grupo experimental de cuatro animales recibió 1×10^{12} PRD de VAA2/1/SERCA2a infundidas mediante un catéter arterial intracoronario en la arteria coronaria izquierda usando una bomba de infusión de Harvard Clinical Technology (HCT). El VAA2/1/SERCA2a se liberó durante un periodo de 8 minutos a una velocidad de flujo constante de 2,5 ml/min. Una vez completada la infusión, la solución restante se retiró del tubo conectando el extremo del catéter guía y la bomba. Esta solución restante se infundió después manualmente durante un periodo de aproximadamente 2 minutos, a lo que siguió un lavado manual lento con 10 ml de solución salina. El grupo control constaba de 5 animales que recibieron tampón de formulación (NaCl 150 mM, HEPES 20 mM y $MgCl_2$ 1 mM a pH 7,4) en lugar de VAA2/1/SERCA2a, bien por infusión directa (ID) o bien mediante un dispositivo V-Focus (Prevolos AC, y col., J. Extra Corpor. Technol. 2006; 38(1):51-2).

PROCEDIMIENTOS CON LOS ANIMALES

Día 0 - Creación de la RM y recuperación

Anestesia, intubación y anticoagulación

[0141] Se inyectaron telazol 6,0 mg/kg IM y atropina 2,0 ml IM para introducir la anestesia. La anestesia general se mantuvo con isoflurano inhalado (1 a 2%) bajo monitorización periódica de los gases en la sangre arterial. Se colocó una vía intravenosa en la vena marginal auricular usando técnicas asépticas y se administró solución

salina IV según fuera necesario. El animal se intubó con un tubo endotraqueal de tamaño apropiado fijado con un manguito inflado para evitar pérdidas. Se colocan almohadillas y electrodos de ECG sobre las áreas metacarpiana y metatarsiana afeitadas para monitorizar y registrar las derivaciones I, II y III en los discos. Los signos vitales (frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, O₂ mediante el oxímetro de pulso, presión arterial) se monitorizaron a intervalos de aproximadamente 5 minutos a lo largo de todo el procedimiento. Se administró heparina para mantener un TCA > 300 segundos.

Inserción de la vaina

[0142] Una vez obtenida la profundidad anestésica apropiada, la nuca se preparó con yodoprovidona y a continuación con etanol al 70%. Se practicó una incisión usando técnicas estériles generales y se insertaron vainas 8 Fr en la arteria y vena carótidas.

Prueba de la función cardiaca

[0143] Se realizó un ecocardiograma inicial.

Creación de una regurgitación de la válvula mitral

[0144] A través de la vaina de la arteria carótida se hizo avanzar una pinza hacia el ventrículo izquierdo (VI). Bajo guiado fluoroscópico se usó la pinza para cortar las cuerdas tendinosas del músculo papilar posterior para crear una regurgitación grave de la válvula mitral (RM). La insuficiencia cardiaca se definió como la dilatación de la cámara ventricular izquierda, la disminución de la PA y el aumento de la PDF tras la confirmación de una RM angiográficamente grave con ventriculograma izquierdo el día 0.

Recuperación

[0145] Una vez que los signos vitales permanecieron estables durante 10 minutos después de completar el procedimiento, se cerró la incisión, se desconectó el isoflurano y se administró una medicación para prevenir la insuficiencia cardiaca aguda. Cualquier posible dolor se alivió de forma rutinaria con 0,005 a 0,01 mg/kg de buprenorfina administrada por vía IM. También se administró a los animales cefazolina para prevenir infecciones (1 g IV).

Días 1-3 - Monitorización y medicación para la insuficiencia cardiaca aguda

[0146] Los animales se exploraron tres veces al día durante los tres primeros días después de la creación de la RM. Los animales se examinaron diariamente en cuanto a señales de insuficiencia cardiaca aguda, infección de la herida en el punto de incisión en la nuca o cualquier señal de dolor o incomodidad. Se administró y registró la medicación para la insuficiencia cardiaca aguda.

Día 56 - Documentación de la insuficiencia cardiaca, aleatorización, muestras de sangre y control de vehículo o administración de VAA2/1/SERCA2a

Prueba de la función cardiaca

[0147] Las imágenes incluían: eje largo, eje corto, eje corto en modo M a nivel de la inserción de los músculos papilares y Doppler color del anillo mitral. Se calcularon y registraron el gasto cardiaco, tau, la fracción de eyección, la fracción de acortamiento del VI, las dimensiones de la pared libre del VI y del tabique y la valoración de la RM.

Asignación a los grupos

[0148] Los animales que sobrevivieron hasta el día 56 (que correspondían a la definición de insuficiencia cardiaca) se asignaron a uno de dos grupos: grupo 1, VAA2/1/SERCA2a a una dosis de 1×10^{12} PRD (n=4), o grupo 2, control de vehículo (n=5).

Procedimientos generales: Administración de VAA2/1/SERCA2a o vehículo por infusión coronaria epicárdica anterógrada (grupos 1-2)

[0149] El día 56 se administró a todos los animales una dosis completa de heparina para obtener un TCA > 300. Se usó un catéter de infusión de arteria coronaria para infundir VAA2/1/SERCA2a o vehículo en la arteria coronaria izquierda usando una bomba de infusión HCT. Los materiales y procedimientos para el implante del catéter se describen en detalle en el ejemplo 2 y en las tablas 3 y 4 anteriores. Se siguió esencialmente el mismo procedimiento.

Grupo 1: Administración de $1,0 \times 10^{12}$ VAA2/1/SERCA2a (infusión del vector durante 8 minutos)

5 **[0150]** Tras un mezclado suave se transfirieron de forma aséptica 0,56 ml de la solución madre de VAA2/1/SERCA2a a un tubo de polipropileno estéril y se diluyó con 10 ml de tampón de formulación (NaCl 130 mM, HEPES 20 mM y $MgCl_2$ 1 mM a pH 7,4), obteniéndose una concentración de 1×10^{11} PRD/ml. Justo antes de la administración al animal se llevaron 10 ml del VAA2/1/SERCA2a diluido (1×10^{11} PRD/ml) a temperatura ambiente y se mezclaron con 10 ml de sangre nativa completa del animal que iba a recibir la dosis, obteniéndose una dilución final en la jeringa de $0,5 \times 10^{11}$ PRD/ml en un volumen final de 20 ml. El circuito de infusión se impregnó con sangre y después se liberó el vector en la arteria coronaria principal izquierda durante un periodo de 8 minutos usando una bomba de infusión HCT. Una vez completada la infusión, la solución restante se retiró del tubo conectando el extremo del catéter guía y la bomba. Esta solución restante se infundió después manualmente durante un periodo de aproximadamente 2 minutos, a lo que siguió un lavado manual lento con 10 ml de solución salina.

15 Grupo 2: Administración de vehículo (infusión de 10 minutos)

20 **[0151]** Para algunos de los animales del grupo control de vehículo (tampón de formulación, NaCl 130 mM, HEPES 20 mM y $MgCl_2$ 1 mM a pH 7,4) se usó el mismo procedimiento que se usó para el grupo 1 descrito anteriormente, con la excepción de que no se administró VAA2/1/SERCA2a. A otros animales del grupo control se les administró tampón de formulación (NaCl 130 mM, HEPES 20 mM y $MgCl_2$ 1 mM a pH 7,4) en la arteria coronaria izquierda en un plazo de 10 minutos usando un dispositivo V-Focus (Prevolos AC, y col., J. Extra Corpor. Technol. 2006; 38(1):51-2). Tanto el procedimiento de infusión coronaria epicárdica anterógrada como el sistema cardiaco V-Focus estudiado previamente liberaron el producto de ensayo o el vehículo directamente en las arterias coronarias durante un periodo de 10 minutos. No existen diferencias entre los animales control sin tratamiento y los animales control que recibieron vehículo administrado mediante el sistema de liberación cardiaca V-Kardia.

Día 112 - Procedimientos de sacrificio terminalAnestesia, intubación y anticoagulación

30 **[0152]** El día 112, los animales supervivientes se anestesiaron, se intubaron y se anticoagularon.

Prueba de la función cardiaca

35 **[0153]** Las imágenes incluían: eje largo, eje corto, eje corto en modo M a nivel de la inserción de los músculos papilares y Doppler color del anillo mitral. Se calcularon y registraron el gasto cardiaco, tau, la fracción de eyección, la fracción de acortamiento del VI, las dimensiones de la pared libre del VI y del tabique y la valoración de la RM. También se realizó un Doppler tisular.

40 Sacrificio terminal

[0154] Los animales se eutanizaron mediante el uso de una solución cardiopléjica y se recogieron muestras de tejido para el análisis de expresión de proteínas y ARNm.

45 Preparación de fracciones microsomales a partir de corazones de cerdo

50 **[0155]** La fracción microsomal, que incluía las vesículas del RS, se preparó a partir de corazones porcinos congelados mediante el procedimiento siguiente. Se pulverizaron en nitrógeno líquido aproximadamente 5 a 10 g de miocardio limpio de grasa y de tejido conectivo y se homogeneizaron con un homogeneizador Potter en una solución tampón que contenía Tris-HCl 5 mM, pH 7,4, EDTA 2 mM y 8,5% de sacarosa. El homogenado se centrifugó a 1.000xg durante 10 min. El sobrenadante se centrifugó después durante 15 min a 9.000xg y el sobrenadante resultante se centrifugó de nuevo dos veces durante 15 min a 20.000xg. Las vesículas del retículo sarcoplasmático presentes en este último sobrenadante de 20.000xg se sedimentaron seguidamente por centrifugación de 1 h a 110.000xg. El sedimento se resuspendió en 500 μ l del tampón de homogeneización. Todos los pasos de centrifugación se realizaron entre 0 y 4°C.

Preparación de extractos proteicos y análisis por inmunotransferencia

60 **[0156]** Las muestras de proteínas de los animales control normales no experimentales y no tratados (control), de los animales transducidos con VAA2/1/SERCA2a (SERCA2a) y de los animales tratados con tampón de formulación (solución salina) se prepararon a partir de fracciones microsomales porcinas aisladas, se igualaron en cuanto a la concentración de proteínas (usando el método de Bradford), se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas de inmunotransferencia se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpos contra la SERCA2a (Affinity Bioreagents, dilución 1:400). Las bandas reactivas se visualizaron

por quimioluminiscencia (PE Life Sciences), se escanearon películas de al menos tres experimentos independientes y se evaluaron las densidades de las bandas inmunorreactivas usando el software NIH Image. Como control interno se usaron los niveles proteicos de la GAPDH. Los valores de densidad de las bandas de SERCA2a se normalizaron respecto a los valores de la GAPDH.

5

Aislamiento de ARN y reacción en cadena de la polimerasa/transcriptasa inversa

[0157] Los niveles de ARNm de la SERCA2a se midieron usando la RT-PCR. Se aisló ARN total de corazones control normales no tratados y no experimentales (control), corazones transducidos con VAA-SERCA2a (SERCA2a) y corazones tratados con tampón de formulación (solución salina), usando el reactivo TRIzol (Invitrogen). Una vez completada la rotura del tejido, se añadió cloroformo y las muestras se agitaron a conciencia antes de incubarlas brevemente a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante (que contenía el ARN) se retiró con cuidado sin alterar los detritus celulares situados debajo. El ARN contenido en la solución sobrenadante se precipitó añadiendo un volumen igual de isopropanol enfriado en hielo, se sedimentó por centrifugación a 12.000 g durante 10 min a 4°C y se lavó con etanol al 75%. Los sedimentos de ARN se resuspendieron en agua exenta de RNasa (Invitrogen). Se sintetizó ADNc a partir de 1 µg de ARN total usando la transcriptasa inversa iScript (Bio Rad) en un volumen final de 20 µl. Como control interno se evaluó el nivel de ARNm de la GAPDH. La temperatura de alineamiento para los ciclos de reacción de la PCR se ajustó conforme a las temperaturas de alineamiento óptimas para cada conjunto de cebadores específico.

20

Resultados

[0158] En las figuras 7 a 13 se representan los resultados del experimento. La figura 7A representa geles de poliacrilamida que muestran la expresión de la proteína SERCA2a (arriba) y del ARNm (abajo) en tres animales control no experimentales, tres animales infundidos con formulación (solución salina) y tres animales tratados con VAA2/1/SERCA2a. La figura 7B es un gráfico que compara la expresión proteica de SERCA2a en los tres grupos de tratamiento, en el que el nivel de expresión proteica se normaliza con respecto a la expresión de la GAPDH. Este experimento muestra que el grupo de VAA2/1/SERCA2a presentaba un mayor nivel de expresión proteica y de ARNm de SERCA2a que el grupo control no experimental o el grupo control infundido con tampón de formulación. La fig. 7B muestra, además, que el nivel normalizado de la expresión de la proteína SERCA2a fue significativamente mayor estadísticamente en el grupo de infusión de SERCA2a que en el control experimental de infusión de solución salina.

[0159] La figura 8 muestra la fracción de acortamiento porcentual del ventrículo izquierdo, que es una medida de la función contráctil del ventrículo. Dos meses después de la administración del vector VAA2/1/SERCA2a la fracción de acortamiento se incrementó en un ~25% en el grupo de tratamiento con respecto al grupo control infundido con tampón de formulación, lo que constituye una mejora significativa. La figura 9 es un gráfico que representa el cambio absoluto en la fracción de acortamiento el día 112 en comparación con el día 56. El cambio medio en la fracción de acortamiento del grupo control experimental con tampón de formulación (tanto los animales de V-Focus como de infusión directa (ID)) es ligeramente negativo, mientras que el grupo infundido con VAA2/1/SERCA2a (fármaco) muestra un aumento sustancial positivo, lo que indica una mejora en la función cardíaca.

[0160] De forma similar, la figura 10 es un gráfico que representa el cambio absoluto en la fracción de eyección el día 112 en comparación con el día 56. El cambio medio en la fracción de eyección del grupo control experimental con tampón de formulación (tanto los animales de V-Focus como de infusión directa (ID)) es de un 5% negativo, mientras que el grupo infundido con VAA2/1/SERCA2a (fármaco) muestra un aumento sustancial positivo (de aproximadamente 10%), lo que indica una mejora en la función cardíaca.

[0161] La figura 11 es un gráfico que representa el cambio absoluto en el gasto cardíaco (ml/min) el día 112 en comparación con el día 56. El cambio medio en el gasto cardíaco del grupo control experimental con tampón de formulación (tanto los animales de V-Focus como de infusión directa (ID)) es menos de 3,5 ml/min, mientras que en el grupo infundido con VAA2/1/SERCA2a (fármaco) es casi el doble del del grupo control (de aproximadamente 6 ml/min), lo que indica una mejora en la función cardíaca.

55

[0162] La figura 12 es un gráfico que representa el cambio absoluto en tau (constante de tiempo de relajación del VI en ms) el día 112 en comparación con el día 56. Tau es una medida cuantitativa de la función diastólica que requiere registrar la presión intraventricular. El cambio medio en el periodo de relajación del grupo control experimental con tampón de formulación (tanto los animales de V-Focus como de infusión directa (ID)) asciende a más de 0,01 ms positivo, mientras que el grupo infundido con VAA2/1/SERCA2a (fármaco) muestra una disminución sustancial negativa (más de aproximadamente 0,005 ms), lo que indica una mejora en la función cardíaca.

60

[0163] Finalmente, la figura 13 es un gráfico que representa el cambio absoluto en el volumen de regurgitación (ml) el día 112 en comparación con el día 56. El cambio medio en el volumen de regurgitación del

grupo control experimental con tampón de formulación (solo los animales de infusión directa (ID)) es de casi 40 ml, mientras que el grupo infundido con VAA2/1/SERCA2a (fármaco) prácticamente no muestra ningún cambio, lo que indica una mejora en la función cardiaca en comparación con el control.

- 5 **[0164]** Además, tanto el ventrículo izquierdo como el derecho eran más pequeños en el grupo de VAA2/1/SERCA2a que en los grupos control (no mostrado), lo que indica un remodelado del tejido cardiaco a causa de la insuficiencia cardiaca menos negativo en el grupo tratado que en el grupo control. En conjunto, estos resultados demuestran que en un modelo animal aceptado de insuficiencia cardiaca, la infusión epicárdica anterógrada prolongada de un vector VAA2/1/SERCA2a transfecta con éxito el tejido cardiaco, dando como resultado una mayor expresión de ARNm y proteína de la SERCA2a, así como mejoras significativas a largo plazo en varios parámetros de la función cardiaca en un modelo aceptado de insuficiencia cardiaca en animales grandes.

Ejemplo 4: Infusión epicárdica anterógrada

- 15 **[0165]** La seguridad, viabilidad y eficacia de una administración intracoronaria única a 3 niveles de dosificación de VAA2/1/SERCA2a en pacientes con insuficiencia cardiaca congestiva se estudian en un ensayo de fase 1, de escalada de dosis, aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo.

Grupos

- 20 **[0166]** La población sujeto se compone de pacientes adultos con una insuficiencia cardiaca crónica de clase III/IV según la escala de la NYHA. Los sujetos se dividen en cuatro grupos y reciben 3×10^{11} PRD de VAA2/1/SERCA2a, 3×10^{12} PRD de VAA2/1/SERCA2a, 1×10^{13} PRD de VAA2/1/SERCA2a o placebo. Los sujetos que reciben VAA2/1/SERCA2a se siguen durante 12 meses. Al cabo de seis meses se levanta el ciego para los sujetos con placebo y se les ofrece el tratamiento con VAA2/1/SERCA2a.

Administración de VAA2/1/SERCA2a

- 30 **[0167]** El objetivo de la infusión es proporcionar una exposición miocárdica difusa y homogénea al VAA2/1/SERCA2a por infusión coronaria epicárdica anterógrada. Existen múltiples escenarios de infusión basados en patrones de colateralización, enfermedades oclusivas y variaciones anatómicas (por ejemplo, la anatomía presente tras una cirugía de derivación), pero el objetivo del clínico es liberar 1/3 del VAA2/1/SERCA2a en el miocardio anterolateral, 1/3 en el posterolateral y 1/3 en el inferior/ inferolateral.

- 35 **[0168]** Bajo anestesia local (típicamente 1 a 2% de lidocaína) y sedación consciente según las normas institucionales apropiadas se accede a las arterias (femoral, radial o braquial, a discreción del usuario) con 6 Fr usando la técnica de Seldinger. Se administra por vía intravenosa/ intraarterial heparina no fraccionada para proporcionar un tiempo de coagulación activada (TCA) de 250 a 300 s. Se realiza una angiografía coronaria y pontografía de manera habitual si no se ha efectuado ninguna en los 2 meses anteriores. Se define la anatomía y se seleccionan la estrategia *in situ* antes de la administración del VAA2/1/SERCA2a para lograr una liberación homogénea en el miocardio perfundido y los catéteres guía 6Fr apropiados. Solo se realizan una o dos infusiones, y las arterias o los injertos de derivación usados para la infusión son el o los dos que sustentan la mayor parte del flujo miocárdico. Dos tercios del producto de VAA2/1/SERCA2a se infunden en la primera secuencia de infusión y 1/3, si fuera necesario, en la segunda secuencia de infusión (final). El catéter guía apropiado seleccionado para la primera infusión se coloca en la primera arteria coronaria/ injerto de derivación (abarcando el área mayor) tras realizar el sangrado retrógrado/ lavado de manera habitual.

- 50 **[0169]** En una zona estéril se rellenan un sistema de infusión MEDRAD (City, PA) o equivalente y una jeringa de 60 cc con la mezcla de VAA2/1/SERCA2a (véase más adelante). El catéter guía se conecta a un equipo de tubos macho-hembra a presión de caudal elevado de 30" y al sistema inyector Medrad para asegurar un espacio líquido-líquido exento de aire. Se aspira sangre, la cual se mezcla con solución salina normal, y a continuación se añade el VAA2/1/SERCA2a para producir las mezclas siguientes en la jeringa del inyector MEDRAD. Es importante que se añada a la jeringa primero la solución sangre/ salina y después el VAA2/1/SERCA2a:

- 55 Cohorte de dosis baja: 3×10^{11} PRD de VAA2/1/SERCA2a

[0170]

- 60 15 ml de sangre
45 ml de solución salina normal para inyección
0,3 ml de una solución de 1×10^{12} PRD de VAA2/1/SERCA2a/ml

Cohorte de dosis media: 3 x 10¹² PRD de VAA2/1/SERCA2a

[0171]

- 5 15 ml de sangre
42 ml de solución salina normal para inyección
3,0 ml de una solución de 1 x 10¹² PRD de VAA2/1/SERCA2a/ml

Cohorte de dosis elevada: 1 x 10¹³ PRD de VAA2/1/SERCA2a

10 **[0172]**

- 15 ml de sangre
35 ml de solución salina normal para inyección
15 10,0 ml de una solución de 1 x 10¹² PRD de VAA2/1/SERCA2a/ml

Cohorte de placebo:

20 **[0173]**

- 15 ml de sangre
45 ml de solución salina normal para inyección

Procedimiento de infusión única

25 **[0174]**

Los 60 ml de solución se infunden a una velocidad de flujo constante de 6 ml/min. Se realiza una angiografía final para evaluar los cambios anatómicos provisionales ocasionados por la infusión. Se retira el catéter guía. Se realiza la extracción y/o el cierre de la vaina femoral a discreción del usuario.

30 Procedimiento de infusión dual

[0175]

En los sujetos que reciben la infusión en dos arterias/ injertos, la primera infusión consiste en un volumen de 40 ml a una velocidad de flujo constante de 6 ml/min. El objetivo es infundir 2/3 del producto de VAA2/1/SERCA2a en el área miocárdica mayor. Una vez infundida la primera porción, se realiza una angiografía final para evaluar los cambios anatómicos provisionales ocasionados por la infusión. Se retira el catéter guía.

35 **[0176]**

A continuación, se elige un catéter guía 6Fr apropiado para la secuencia de infusión en el área miocárdica menor (1/3) perfundida. El catéter guía se coloca en la arteria/ injerto de derivación y se conecta al equipo de inyección Medrad como se ha descrito anteriormente, y se infunde el 1/3 final del producto de VAA2/1/SERCA2a (volumen 20 ml, velocidad de flujo constante de 6 ml/min). Se realiza una angiografía final para evaluar los cambios anatómicos provisionales ocasionados por la infusión. Se retira el catéter guía. Se realiza la extracción y/o el cierre de la vaina femoral a discreción del usuario.

45 Características anatómicas

[0177]

Pueden existir múltiples escenarios anatómicos que determinan la elección de la arteria para la infusión con el fin de lograr una liberación de 2/3 del producto en el área miocárdica "mayor" perfundida y una infusión de 1/3 en el área "menor":

50 (1) *Coronariopatía no obstructiva/ arterias coronarias normales, sin cirugía de derivación coronaria previa (CABG)* - colocación de un catéter guía convencional en la arteria coronaria principal izquierda con infusión de 2/3 en los sistemas coronarios izquierdos (arterias descendente anterior izquierda y circunfleja izquierda); colocación de un catéter guía convencional en la arteria coronaria derecha (ACD) e infusión de 1/3 en el sistema ACD.

55 (2) *Sin CABG previa, oclusión total de la ACD, colateralización coronaria de izquierda a derecha* - colocación de un catéter guía en la arteria principal izquierda, se libera el 100% del producto para infundir todas las áreas (ADA1, ACx1 y ACD).

60 (3) *Sin CABG previa, oclusión total de la ADA1 y/o ACx1, colateralización de derecha a izquierda desde la ACD* - en estas circunstancias, la ACD se convierte en el área "mayor" y se liberan 2/3 del producto en la ACD y 1/3 en el sistema coronario izquierdo.

(4) *Enfermedad oclusiva multivaso, sin CABG previa* - 2/3 del producto se liberan en el área que abastece la mayor parte del miocardio, 1/3 en la menor.

(5) CABG previa, injertos abiertos - 2/3 se liberan en el injerto hacia la ADAI, 1/3 se libera en el injerto hacia la ACD.

5 (6) CABG previa, enfermedad coronaria oclusiva mixta con injerto de derivación y nativa - nativa o injerto de derivación, infusión de 2/3 en el vaso que abastece el área miocárdica mayor, 1/3 en el área menor.

10 **[0178]** Cabe destacar que las variantes anatómicas difieren de un individuo a otro, pero para un individuo típico la realización preferida consiste en liberar 2/3 del producto en el área perfundida mayor y 1/3 en la menor (la excepción es la infusión única del 100% del producto si una sola arteria nativa o injerto de derivación suministra la mayor parte del flujo miocárdico).

Valoración de la función cardiaca

15 **[0179]** Los criterios de valoración principales de la actividad/ eficacia que se evalúan y comparan dentro y entre los grupos de tratamiento en base a los cambios observados a los 3, 6 y 12 meses después de la administración de VAA2/1/SERCA2a en relación con los valores iniciales incluyen uno o más de los siguientes: VO₂ max valorado mediante la prueba de ejercicio cardiopulmonar; valoraciones ecocardiográficas que incluyen la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, las dimensiones del VI, el movimiento regional de la pared, la función diastólica y la regurgitación mitral; la distancia recorrida durante la prueba de marcha de 6 minutos; la clasificación según la NYHA; y el nivel del péptido natriurético de tipo B (BNP).

Resultados

25 **[0180]** En los grupos de tratamiento se observa una mejora sustancial y significativa en uno o más de los criterios de valoración anteriores de la actividad/ eficacia en comparación con el grupo placebo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una composición polinucleotídica terapéutica que comprende una secuencia codificante de la SERCA2 en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de cardiopatías mediante la infusión del polinucleótido en un vaso sanguíneo de la circulación coronaria durante un periodo de al menos tres minutos, sin aislar, o sin aislar sustancialmente, la circulación coronaria de la circulación sistémica, en la que dicho polinucleótido está empaquetado en una partícula resistente a DNasa (PRD) de un vector vírico y el número total de PRD infundidas es inferior o igual a 1×10^{14} , y en la que el polinucleótido terapéutico transfecta células cardíacas, cuyo resultado es el tratamiento, la prevención o la mejora de la cardiopatía.
- 10 2. Composición polinucleotídica terapéutica que comprende una secuencia codificante de la SERCA2a para el uso en el tratamiento o la prevención de cardiopatías mediante la infusión del polinucleótido en un vaso sanguíneo de la circulación coronaria durante un periodo de al menos tres minutos, sin aislar, o sin aislar sustancialmente, la circulación coronaria de la circulación sistémica, en la que dicho polinucleótido está empaquetado en una partícula resistente a DNasa (PRD) de un vector vírico y el número total de PRD infundidas es inferior o igual a 1×10^{14} , y en la que el polinucleótido terapéutico transfecta células cardíacas, cuyo resultado es el tratamiento, la prevención o la mejora de la cardiopatía.
- 15 3. Uso según la reivindicación 1 o composición para el uso según la reivindicación 2, en el que el flujo de salida de la circulación coronaria no está restringido de forma no natural.
- 20 4. Uso o composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha enfermedad es la insuficiencia cardíaca congestiva.
- 25 5. Uso o composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho vaso sanguíneo es la arteria coronaria izquierda o la arteria coronaria derecha.
- 30 6. Uso o composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha infusión en dicho vaso sanguíneo se realiza a una velocidad de flujo inferior o igual a 10,0 ml/min.
- 35 7. Uso o composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha infusión en dicho vaso sanguíneo se realiza a una velocidad de flujo inferior o igual a 6,0 ml/min.
- 40 8. Uso o composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la transfección de las células cardíacas del ventrículo lateral anterior, del ventrículo lateral inferior, del tabique y del ventrículo derecho con el polinucleótido terapéutico se puede detectar usando PCR.
- 45 9. Uso o composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el número total de PRD infundidas es inferior o igual a 1×10^{13} .
- 50 10. Uso o composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho vector vírico es un virus adeno-asociado (VAA).
- 55 11. Uso o composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho vector vírico es un vector VAA1.
- 60 12. Uso o composición para el uso según la reivindicación 10, en el que dicho vector vírico VAA comprende proteínas heterólogas de la cápsida, de modo que las proteínas de la cápsida VP1, VP2 y VP3 no son todas del mismo serotipo del VAA.
- 65 13. Uso o composición para el uso según la reivindicación 10, en el que dicho vector vírico es un vector VAA2/1.
14. Uso o composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicho polinucleótido está unido funcionalmente a un promotor basado en el CMV y está empaquetado en dicho vector vírico.
15. Uso o composición para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho vector vírico es VAA2/1, dicho polinucleótido comprende una secuencia codificante de la SERCA2a, dicho vaso sanguíneo es la arteria coronaria izquierda, derecha o izquierda y derecha, dicha infusión de dicho polinucleótido dura al menos 8 minutos y dicha velocidad de flujo de dicha infusión es inferior o igual a 6,0 ml/min.
16. Uso o composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que dicha transfección de dichas células cardíacas aumenta la fracción de acortamiento del ventrículo lateral cuando se mide 4 meses después de dicha infusión, en comparación con la fracción de acortamiento del ventrículo lateral antes de la infusión del polinucleótido.

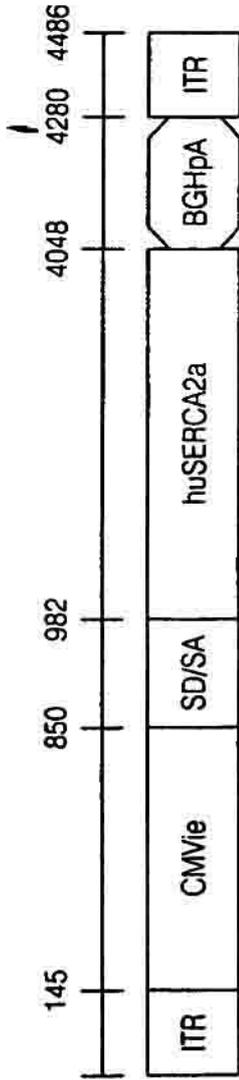


FIG. 1

Genoma del VAA natural



Genoma del VAAr MYDICAR



FIG. 2

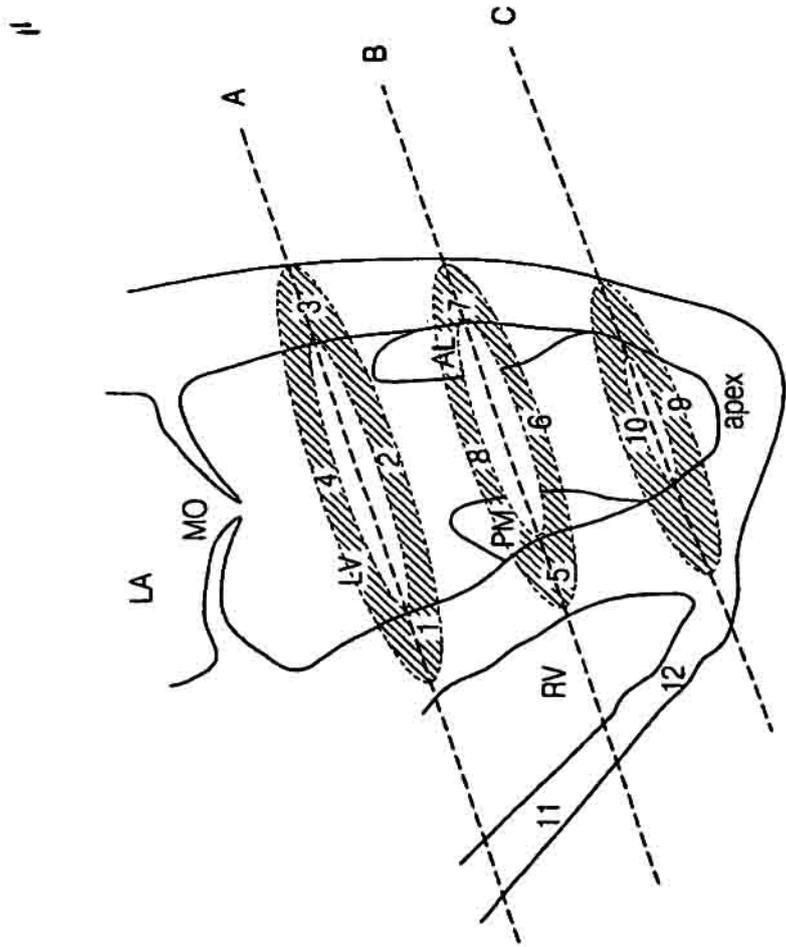


FIG. 3

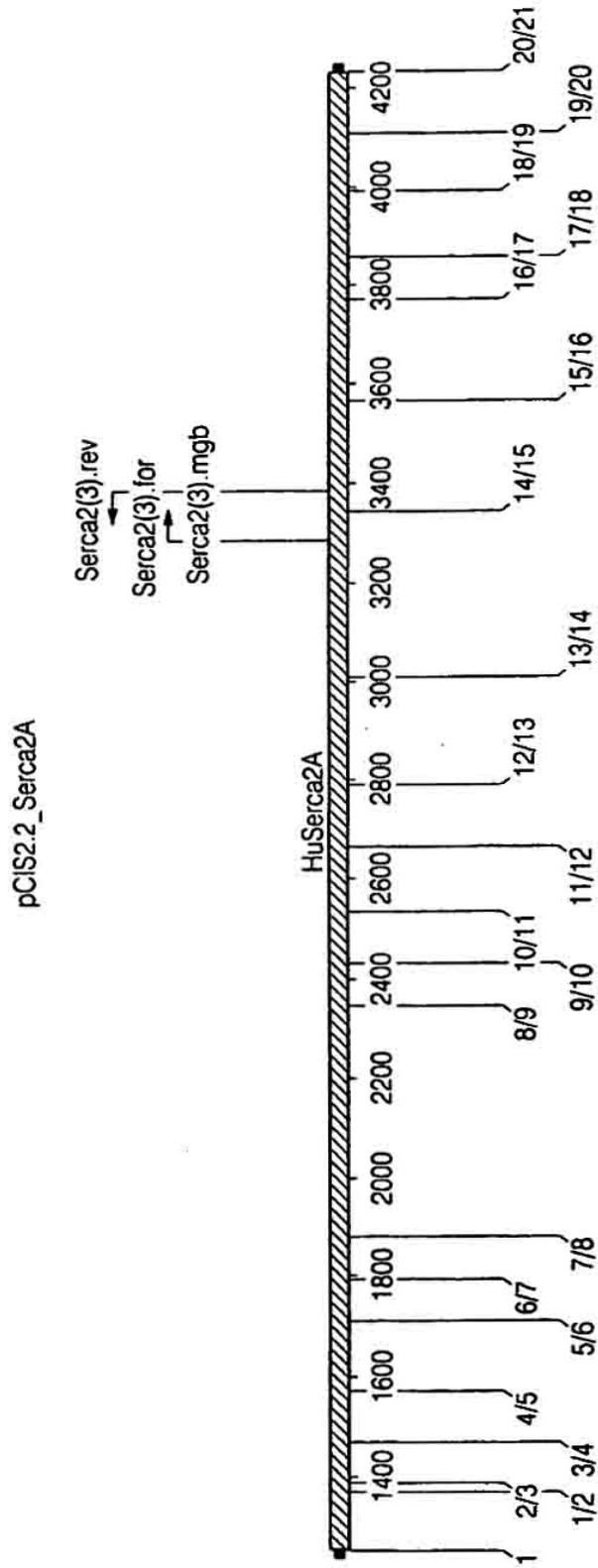


FIG. 4

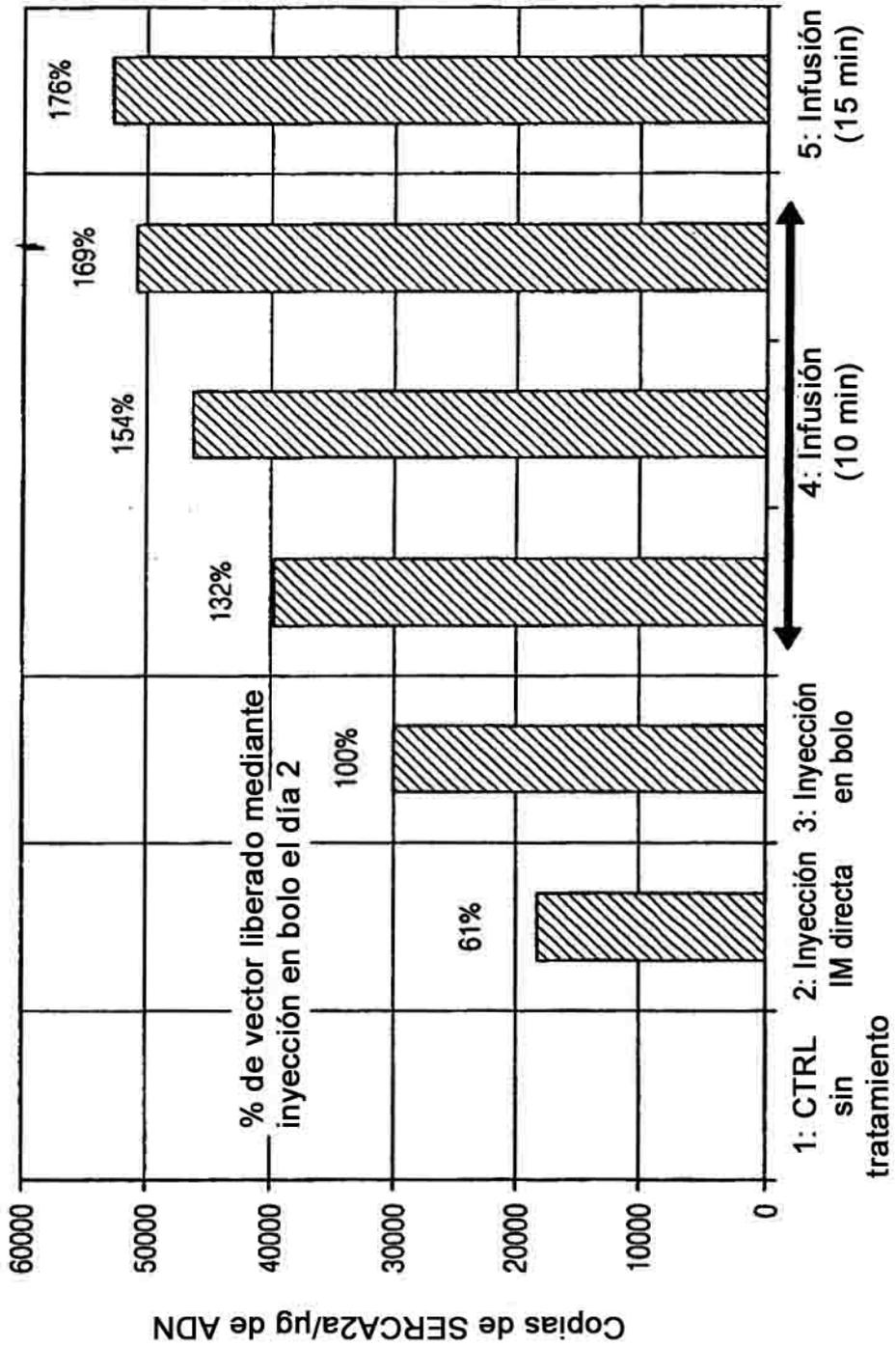


FIG. 5

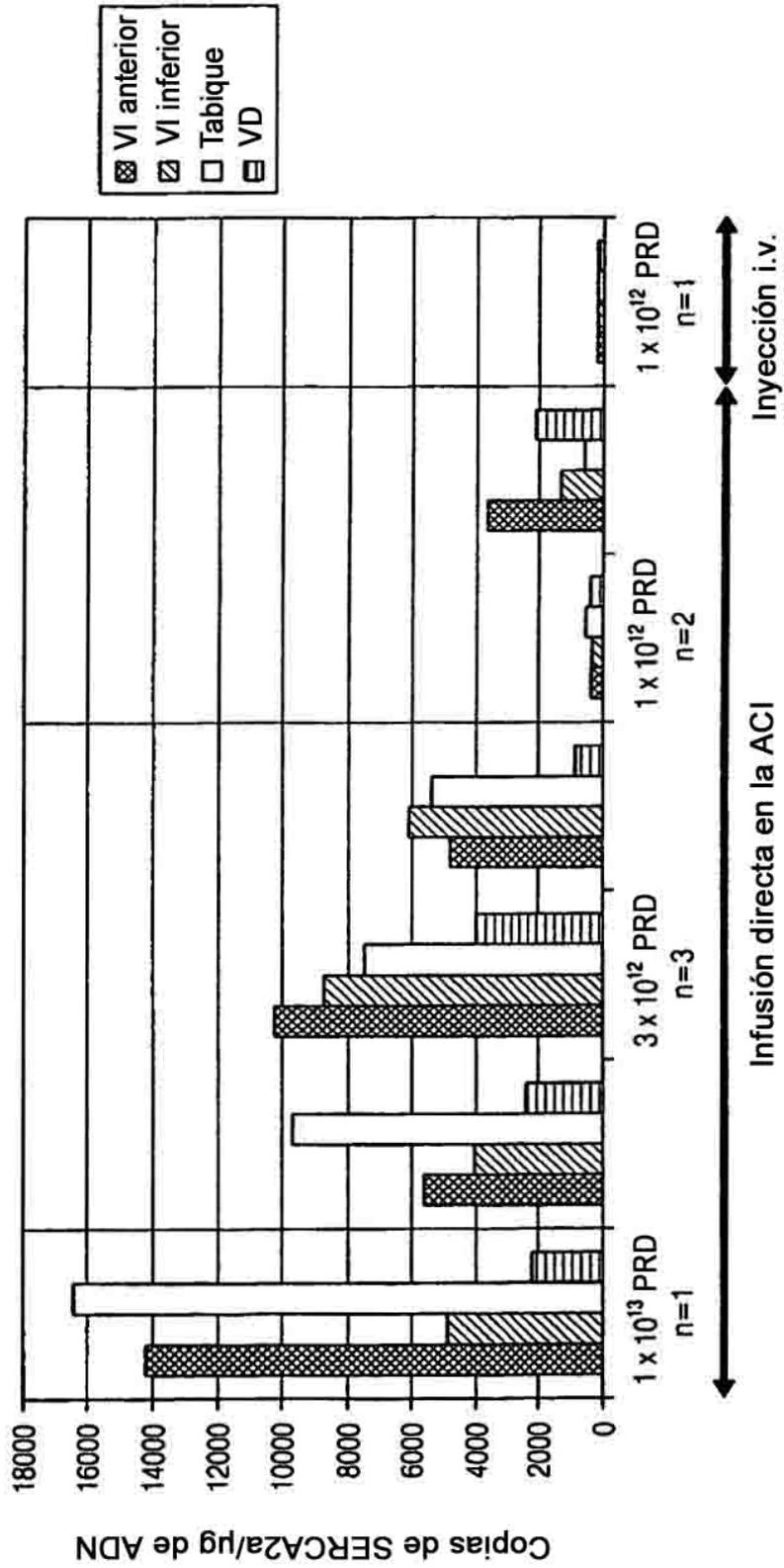


FIG. 6

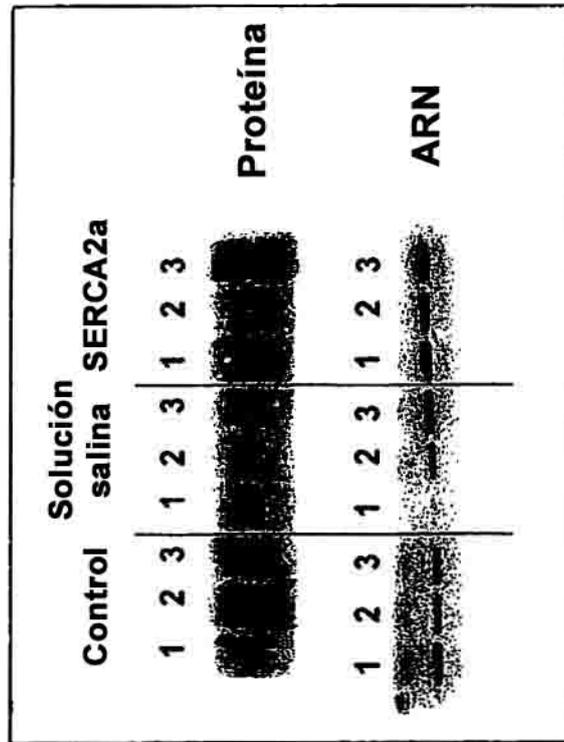


FIG. 7A

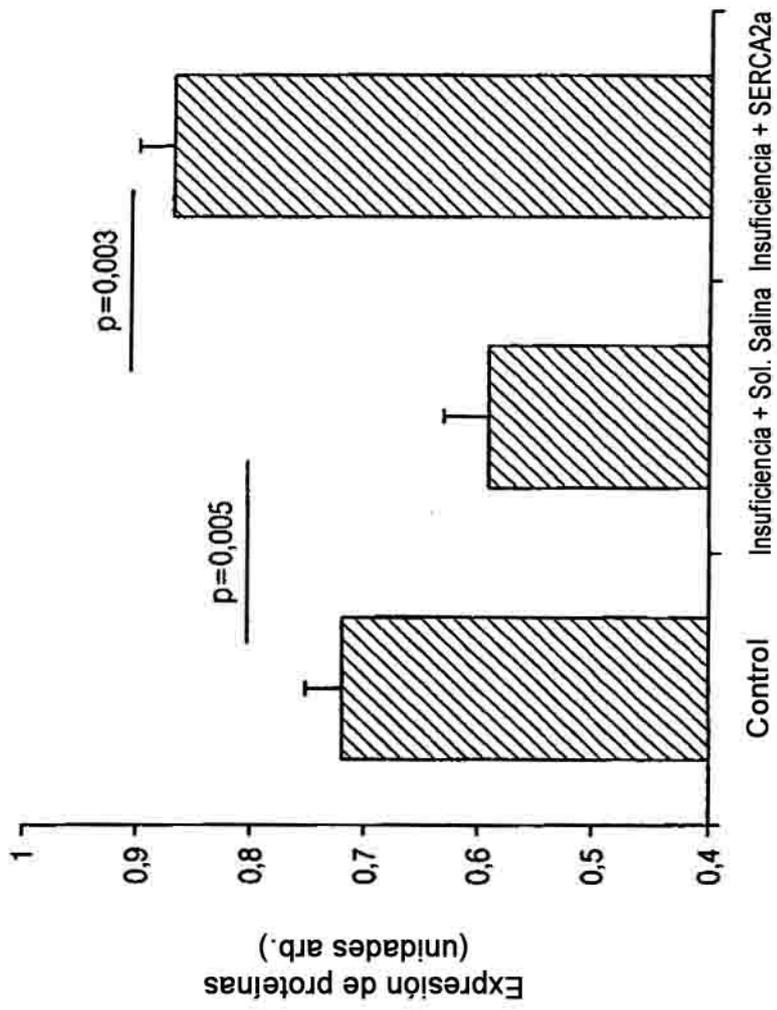


FIG. 7B

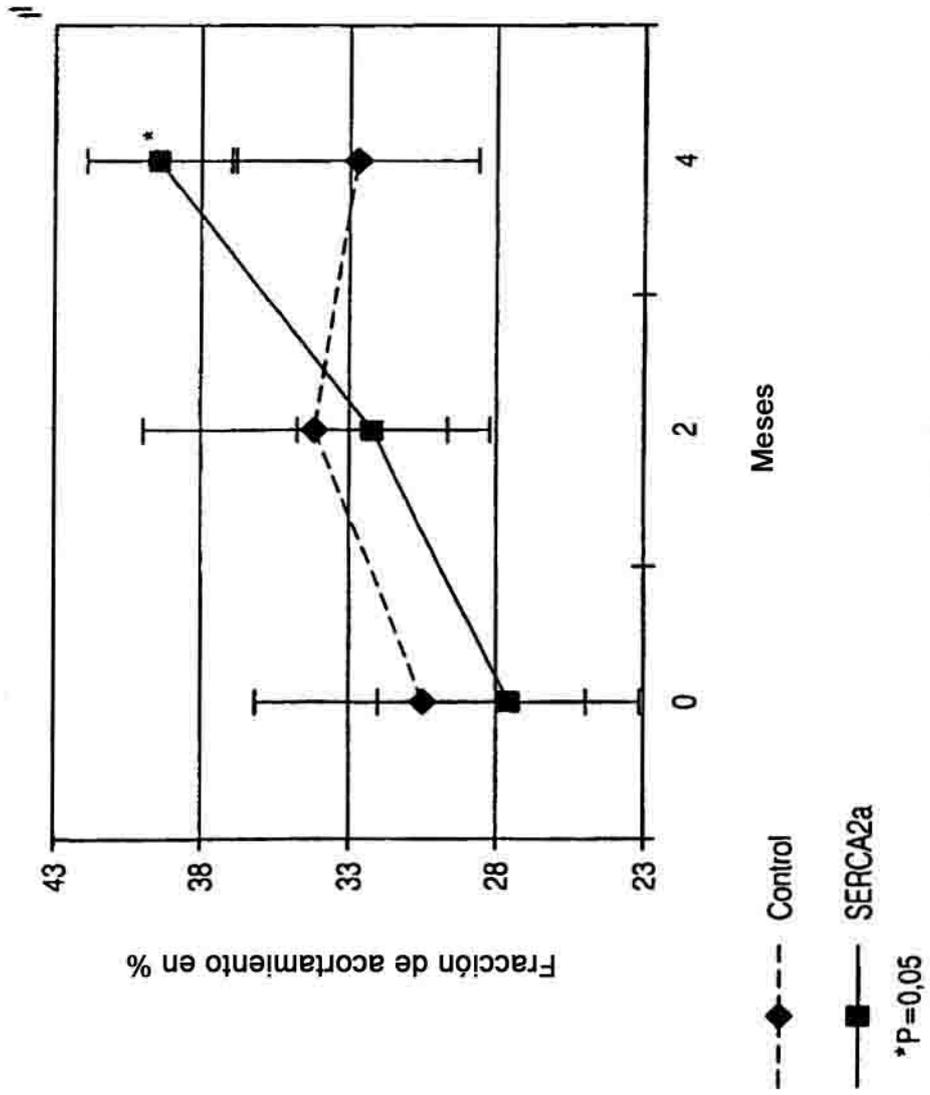


FIG. 8

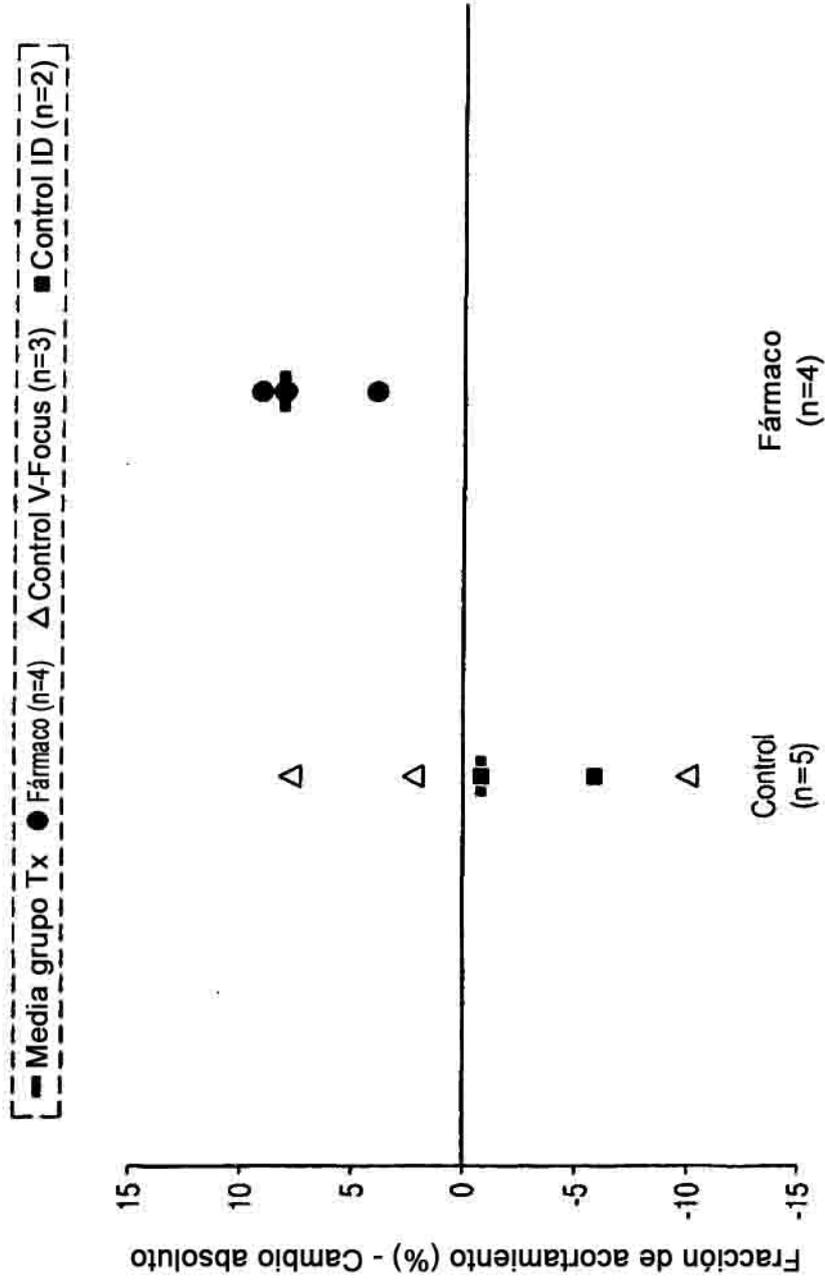


FIG. 9

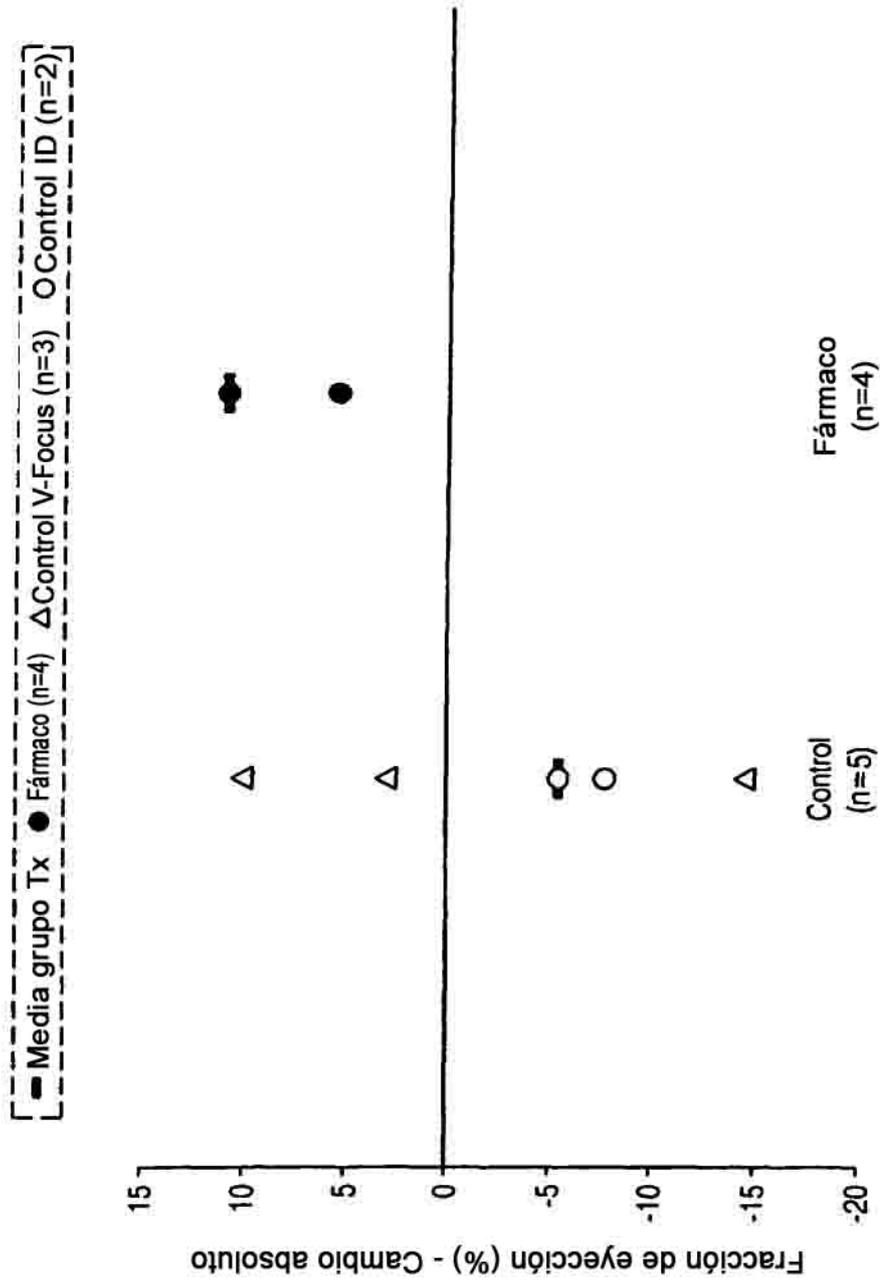


FIG. 10

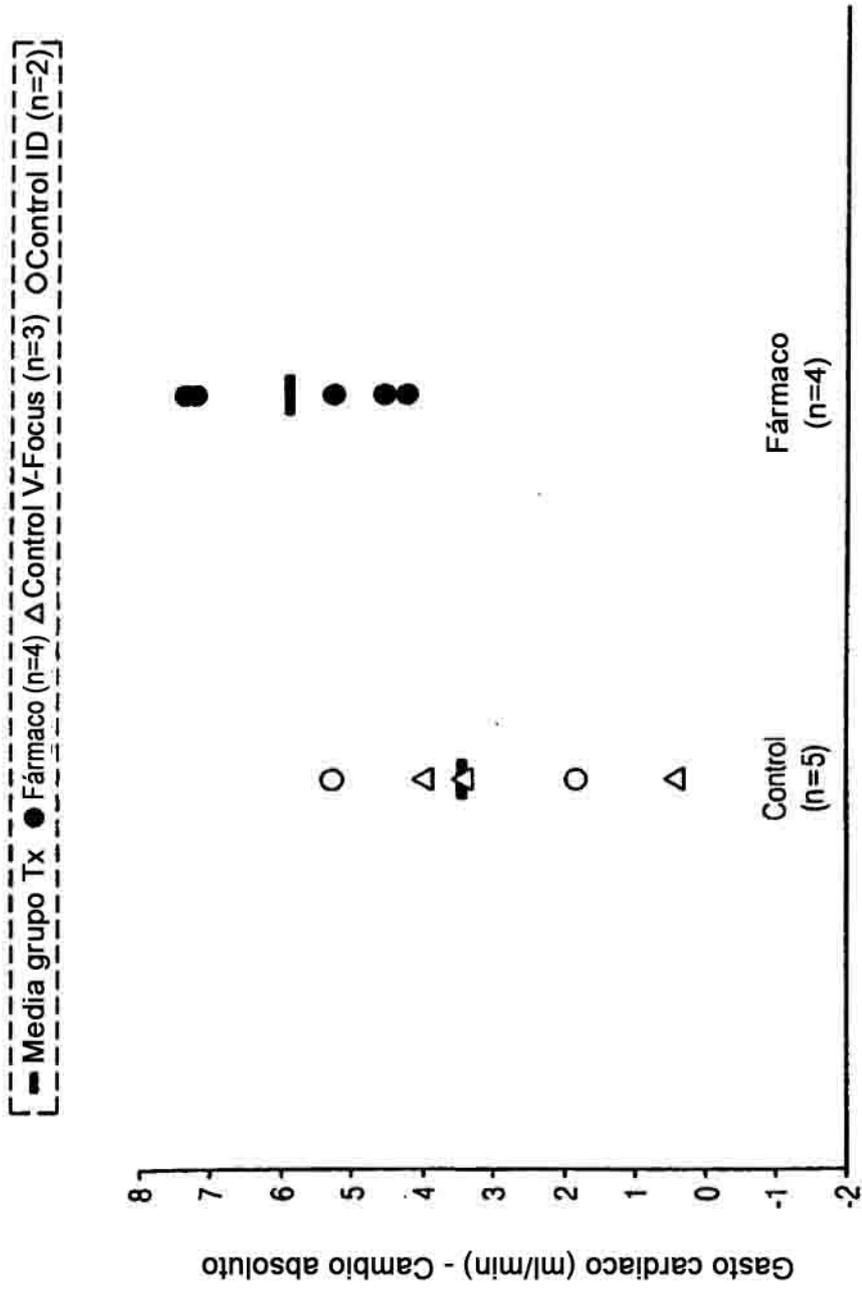


FIG. 11

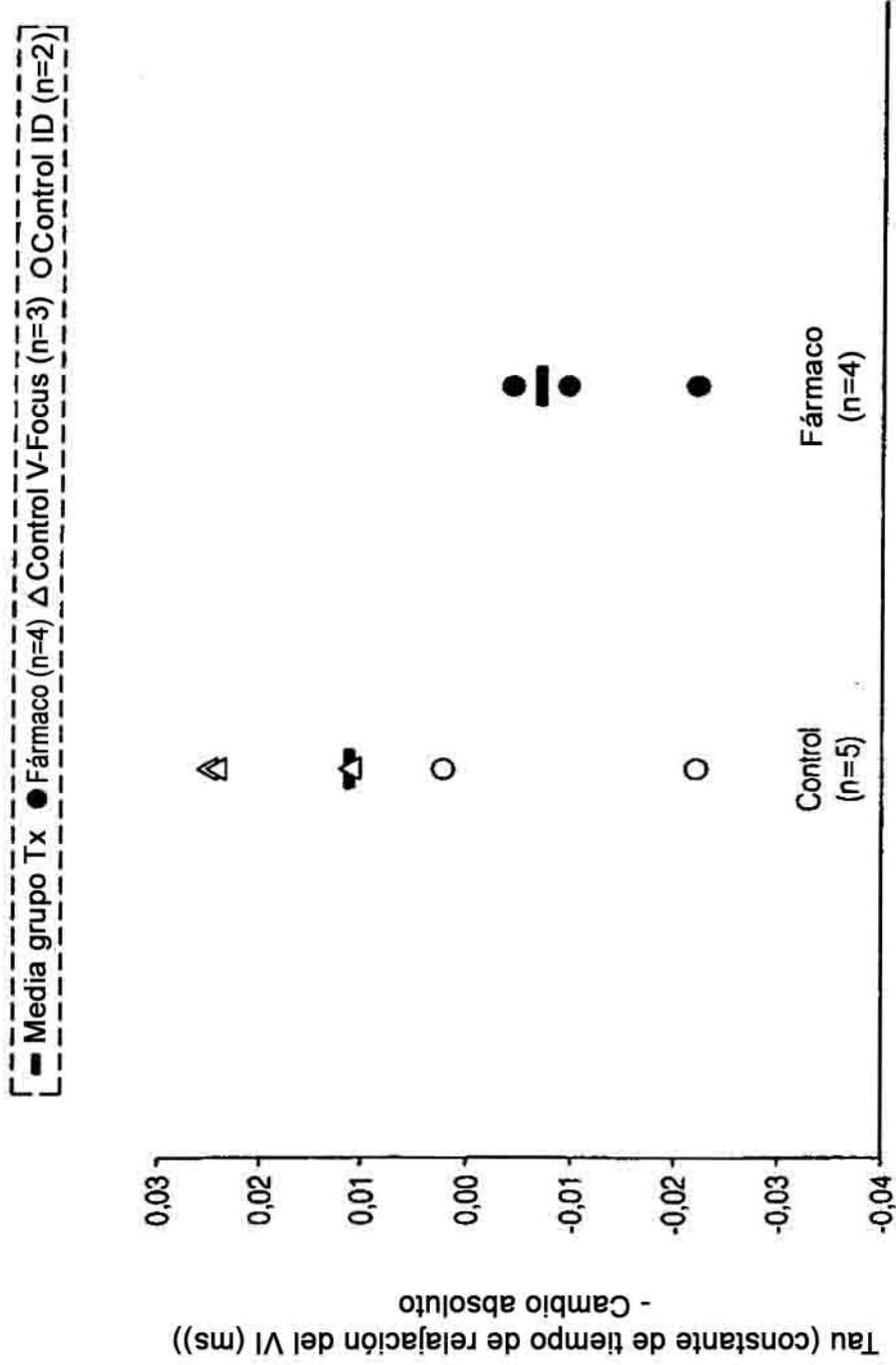


FIG. 12

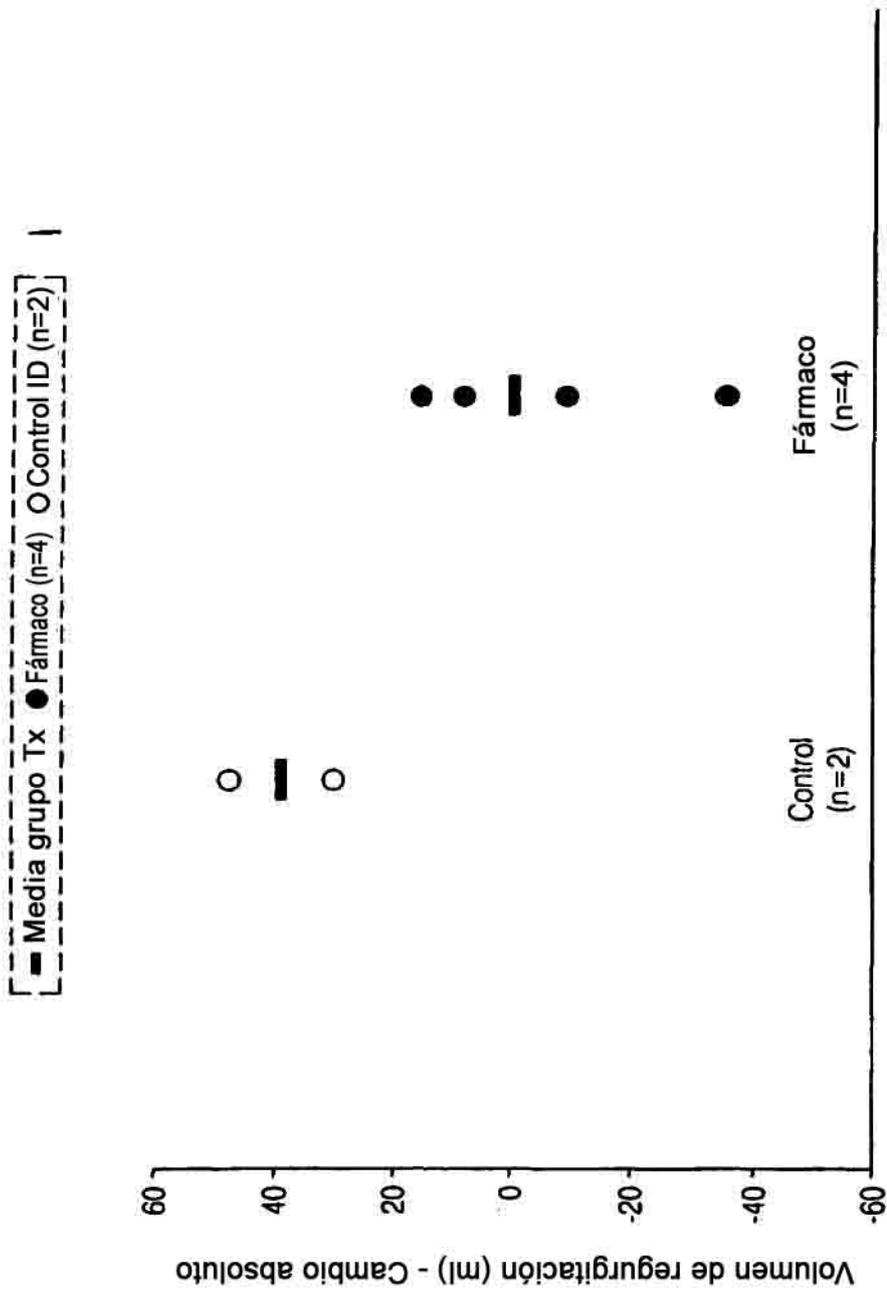


FIG. 13