

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 465 190**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2007 E 07858225 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 2126084**

54 Título: **Secuencia polinucleotídica para la inhibición de la síntesis de fosfolambano**

30 Prioridad:

29.12.2006 EP 06090225

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2014

73 Titular/es:

**CHARITÉ - UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
(50.0%)
Charitéplatz 1
10117 Berlin, DE y
FREIE UNIVERSITÄT BERLIN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**FECHNER, HENRY;
KURRECK, JENS y
PRÖMEL, SIMONE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 465 190 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

Secuencia polinucleotídica para la inhibición de la síntesis de fosfolambano

5 La presente invención se refiere a reactivos que facilitan la inhibición de fosfolambano en tejido cardíaco de animales superiores. Más específicamente, la invención se refiere a secuencias polinucleotídicas capaces de regular negativamente la expresión de fosfolambano en una célula de paciente, como se especifica en las reivindicaciones independientes.

La insuficiencia cardíaca y la insuficiencia cardíaca congestiva son patologías de gran importancia. Están asociadas a deficiencias en la contractilidad cardíaca y anomalías en el tráfico de calcio intracelular.

10 El fosfolambano (PLB) es una proteína de membrana integral de 52 aminoácidos que forma parte en la regulación de la bomba de ión de calcio en células musculares. En células musculares cardíacas, el PLB controla la bomba de ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoendoplásmico (SERCA). La relación de PLB/SERCA influye en la contractilidad cardíaca. La expresión aumentada de SERCA y la inhibición de PLB funcionan ambas hacia una contractilidad mejorada en cardiomiocitos deteriorados. El ARNm (cds) del fosfolambano está publicado en la base de datos nucleotídica del National Center of Biotechnology Information (NCBI) como NM_002667.2.

15 Se ha mostrado que la sobreexpresión de SERCA puede restaurar la contractilidad, el tráfico de calcio y la respuesta de frecuencia en cardiomiocitos aislados (Del Monte *et al.*, Circulation 1999, 100: 2308-2311).

Son posibles diferentes enfoques para la regulación negativa de la actividad de PLB en una célula. El documento US2004121942A1, por ejemplo, emplea la expresión de proteína PLB mutada exógena para alcanzar este efecto.

20 Es otro enfoque el uso de ácido ribonucleico (ARN) tal como anticodificante o ARNip para suprimir la expresión génica al nivel de control de ARNm.

Esto se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/080985, que da a conocer varias moléculas de ARNip correspondientes a una porción de la secuencia de ácido nucleico de fosfolambano, que son capaces de inhibir la expresión de fosfolambano en una célula. Este documento menciona también que podría ser posible usar un vector de expresión que comprende ADN que codifica dicho ARNip, en el que el vector puede ser un vector adenovírico.

25 Puesto que el ARN no es una molécula estable que se preste fácilmente a formulación y uso farmacéutico, la aplicación directa de moléculas de ARN no es necesariamente el enfoque clínico más prometedor para aplicar ARN a la gestión de enfermedades humanas. Es un enfoque que elude la inestabilidad del ARN el uso de ribonucleótidos químicamente modificados, tales como moléculas de esqueleto de tiofosfato o restos de 2'-desoxipurina o 2'-O-metilpirimidina. Enfoques comparables durante la época anticodificante han padecido problemas de toxicidad causados por las moléculas y sus productos de degradación.

30

Es un enfoque alternativo que evita la aplicación de moléculas de ARN transcribir el ARN en la célula del paciente a partir de módulos de expresión de ácido desoxirribonucleico (ADN). El ADN es más estable en muchas condiciones encontradas en el suministro de fármacos, y son conocidas diferentes tecnologías para suministrar módulos de expresión de ADN a las células de pacientes. Estas incluyen transferencia vírica, bombardeo de células mediado por partículas, inyección de ADN desnudo o ADN complejado con policationes o liposomas en el tejido, y otros procedimientos conocidos en el contexto de la denominada "terapia génica".

35

Se ha intentado restaurar la contractilidad de células de músculo cardíaco deterioradas *in vitro* mediante la inhibición de la expresión de PLB con moléculas de ARN anticodificantes expresadas a partir de vectores adenovíricos en cardiomiocitos cultivados (Eizema *et al.*, Circulation 2000; 101; 2193-2199; y Del Monte *et al.*, Circulation 2002; 105; 904-907).

40

Diferentes enzimas transcriben ARN a partir de ADN en una célula eucariótica, específicamente la ARN polimerasa I, II y III. La transcripción de cada polimerasa está controlada por diferentes elementos reguladores que regulan la expresión del gen asociado. Tradicionalmente, la expresión de moléculas cortas no de ARNm a partir de módulos de expresión introducidos artificialmente en células ha hecho uso de la ARN polimerasa III (Pol-III). La Pol-III sintetiza ARN ribosómico de 5S y ARNt. La actividad de ARN Pol-III no está controlada de forma específica de célula. El documento US2005064489 describe promotores de Pol-III regulados por el sistema transactivador de tetraciclina. Dichos promotores condicionalmente activos ofrecen la ventaja de ser capaces de controlar el estado de actividad del transgén introducido artificialmente en un paciente; sin embargo, no ofrecen especificidad celular si se aplican al cuerpo entero de un paciente por suministro sistémico.

45

50 En cualquier enfoque clínico que intente regular la expresión génica, la especificidad celular o tisular es un elemento altamente deseable de control y seguridad. Por ello, serían ventajosos medios para facilitar la expresión de ARN orientado a PLB a partir de promotores específicos de célula tales como promotores de ARN polimerasa II para el control de la expresión de fosfolambano en células cardíacas.

Se ha intentado la regulación anticodificante de PLB por promotores de Pol-II expresando ARN anticodificante bajo el control del promotor de CMV o del factor natriurético auricular inducible (ANF) (Eizema *et al.*, Circulation 2000; 101; 2193-2199).

5 Los intentos de regular negativamente la expresión de proteínas intracelulares mediante enfoques anticodificantes no han conseguido generalmente el éxito clínico esperado por la tecnología en el momento de su implantación. Es un nuevo enfoque para regular negativamente la expresión génica intracelular el uso de las denominadas moléculas de ARN interferente pequeño (ARNip). Estas son pares de moléculas de ARN bicatenario pequeñas de típicamente 19-29 pares de bases de longitud, una de cuyas hebras es complementaria de una sección del ARNm. El ARNm
10 diana se degrada por el complejo RISC. Las moléculas de ARNip se descubrieron originalmente en plantas (Hamilton y Baulcombe, Science. 29 de oct. de 1999; 286(5441): 886), y después en células de mamífero (Elbashir *et al.*, Nature. 24 de mayo de 2001; 411 (6836): 428-9, WO0244321).

15 Está estrechamente relacionado el descubrimiento de microARN o miARN. Estas son moléculas de ARN sintetizadas naturalmente a partir de genes codificados genómicamente que, tras procesamiento por actividades modificadoras del ARN celular, dan lugar a estructuras de horquilla de ARN corta con estructuras de tallo de 11 pb (pares de bases). El miARN se orienta también a ARNm para degradación y es probablemente un mecanismo de control de la expresión génica en la célula.

El documento US26198825A1 muestra secuencias de ARNip que se sugiere que se orientan a la síntesis de fosfolambano.

20 Es un enfoque de la generación de ARNip *in vivo* la generación del denominado ARN de horquilla pequeño (ARNhp), que es un precursor natural del ARNip. Dichas moléculas de ARNhp pueden generarse mediante la expresión de una molécula de ARN parcialmente autocomplementaria a partir de un módulo de expresión introducido en una célula eucariótica. La tecnología se revisa por McIntyre y Fanning (BMC Biotechnol. 2006; 6: 1).

25 Los inventores han publicado recientemente los resultados de un experimento *in vitro* en los que se reducen ARNm de PLB y proteína, y se aumenta la captación de Ca, en cardiomiocitos de rata recién nacida primarios cultivados por ARNhp expresado a partir de constructos adenovíricos activados por promotor de polimerasa III (Fechner *et al.*, Gene Therapy 2007, 14, 211-218).

30 Existen obstáculos técnicos adicionales para expresar ARNhp a partir de promotores de Pol-II. Este problema ha conducido recientemente al desarrollo de los denominados vectores generadores de miARNip (ARNip basados en microARN) que pueden usarse para activar la generación de ARNip a partir de un promotor de Pol-II (Shin *et al.*, Proc. Nat. Acad. USA 103, 13759-13764). El miARNip puede describirse como una secuencia de ARNhp embebida entre secuencias flanqueantes de microARN particulares. Esta tecnología se ha puesto recientemente a disposición por Invitrogen Inc. como el plásmido pcDNA6.2-GW/miR. Este plásmido comprende el promotor de CMV (promotor temprano inmediato de citomegalovirus) como elemento de expresión de Pol-II. El promotor de CMV activa la transcripción de polimerasa II de forma constitutiva no específica de tejido. La generación de secuencias de
35 miARNip a partir de secuencias de ARNhp no es.

Pueden emplearse diferentes vectores víricos para transferencia génica en las células de un paciente. Se han empleado retrovirus, especialmente lentivirus. La transferencia génica mediada por lentivirus puede conducir a la integración estable de un transgén en una célula no en división. Los miembros de la familia de los herpesvirus se han empleado también para transferencia génica.

40 Como se expone anteriormente, con fines de suministro sistémico a un agente que induce la expresión transgénica en un paciente, la especificidad de tejido de la expresión es altamente deseable. Son conocidos promotores de Pol-II específicos de tipo celular o tejido para diferentes tejidos. Sin embargo, es una desventaja de la amplia mayoría de estas secuencias promotoras su longitud. Las secuencias de ADN de más de cierto tamaño son difíciles o imposibles de usar para enfoques de terapia génica que hacen uso de vectores transgénicos plasmídicos o víricos, ya que los últimos tienden a tolerar solo un intervalo de tamaño limitado para secuencias transgénicas.
45

Además, el suministro *in vivo* de ARNhp a partir de un promotor de polimerasa III constitutivo de un vector de AAV puede conducir a la muerte de los animales experimentales por toxicidad hepática aguda. Una evaluación de 49 vectores de AAV/ARNhp distintos, únicos en longitud y secuencia y dirigidos hacia 6 dianas, mostró que 36 dieron como resultado lesión hepática dependiente de la dosis, causando 23 en última instancia la muerte (Grimm *et al.*,
50 Nature, 441, 537-541).

Por tanto, sería deseable un sistema de expresión para la expresión de una molécula de ARN que pueda conducir a la regulación negativa de la expresión de fosfolambano en una célula del corazón, de manera específica de tipo celular.

55 Es un objetivo de la invención proporcionar un reactivo que pueda aplicarse a un paciente que padezca una afección asociada a la actividad del fosfolambano, o una afección que podría beneficiarse de la reducción de la expresión de fosfolambano, en que el reactivo, tras la aplicación a un paciente, conduce a la regulación negativa de la síntesis de fosfolambano en células cardíacas del paciente de manera específica del tipo celular.

Es otro objetivo proporcionar una molécula de ARN novedosa que pueda conducir a la regulación negativa de la expresión de fosfolambano en una célula del corazón.

Estos objetivos se alcanzan por la invención como se especifica en las reivindicaciones independientes.

Según un aspecto de la invención, se proporciona una secuencia polinucleotídica de ADN que comprende:

- 5 a. un primer elemento de secuencia que, cuando se transcribe por una ARN polimerasa, conduce a la transcripción de un ARNip basado en microARN (miARNip) y da lugar a un transcrito capaz de formar una estructura de horquilla parcialmente autocomplementaria que puede procesarse por una célula de mamífero hasta un producto de ARNip capaz de degradar un ARNm en dicha célula, en el que el ARNm degradado por el producto de ARNip codifica fosfolambano,
- 10 b. una secuencia promotora ligada operativamente al primer elemento de secuencia, siendo operativa dicha secuencia promotora por una ARN polimerasa de origen natural en una célula de mamífero, en la que la secuencia promotora es un promotor específico de célula de cardiomiocito, y
- c. una secuencia de empaquetamiento polinucleotídico de ADN derivado de virus;

15 en la que el miARNip comprende al menos una de las secuencias SEQ ID NO 001, SEQ ID NO 002 o SEQ ID NO 003.

20 “Autocomplementario” en el contexto de este documento significa que la molécula de ARN tiene dos tramos de secuencia que permiten el apareamiento canónico de bases en dirección 5' a 3' de un tramo de secuencia con el otro en orientación inversa, de modo que el polímero lineal de ARN puede replegarse sobre sí mismo produciendo una estructura de ARN de doble hélice. Dicha molécula de ARN de horquilla, formada por ejemplo transcribiendo una secuencia de ADN transgénica con una ARN polimerasa dependiente de ADN en una célula, puede procesarse por actividades procesadoras de ARN intracelular, proporcionando una molécula de ARNip funcional capaz de regular negativamente la expresión del ARNm al que está orientada, que en caso de la presente invención es ARNm de fosfolambano.

25 Sorprendentemente, se ha encontrado que las secuencias de miARNip de la presente invención orientadas a fosfolambano eran aproximadamente dos órdenes de magnitud más eficaces en la supresión de la expresión de PLB que los ARNhp del estado de la técnica mostrados en Fechner *et al.* (*Gene Therapy* 2007, 14, 211-218).

30 La estructura de horquilla de las moléculas de miARNip de la presente invención puede definirse también como que una de sus hebras hibridantes es altamente similar a una secuencia comprendida en la secuencia de ARNm de fosfolambano, cuya referencia de GeneBank se da anteriormente. La cuantificación de la similitud de secuencia es bien conocida en la técnica de la biología molecular; se encuentran herramientas informáticas para la cuantificación de la similitud de secuencias, entre otros sitios, en el sitio web de EMBL-EBI en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/similarity.html>. Según la invención, las secuencias hibridantes de la molécula de ARN pueden ser un 80, 85, 90, 95, 97 o 100 % similares a un tramo de secuencia en ARNm de fosfolambano, por ejemplo la secuencia de codificación de ARNm de fosfolambano, la región 5' no traducida o la región 3' no traducida.

35 Según otro aspecto de la invención, se proporciona un módulo de expresión para la expresión intracelular de un ARN inhibidor específico de fosfolambano, que puede procesarse por la célula en que se expresa, para regular negativamente la expresión de la síntesis de fosfolambano por esa célula. Dicho módulo de expresión comprende una secuencia promotora operativa en una célula de mamífero por una ARN polimerasa de mamífero y una secuencia transcrita, a la que se hace referencia también como el primer elemento de secuencia.

40 Se prefiere un módulo de expresión en que la secuencia promotora operativa en una célula de mamífero sea un promotor de ARN polimerasa II dependiente de ADN específico de tejido. Son ejemplos de dichos promotores preferidos las secuencias SEQ ID 7, 8 y 9. Para uso del módulo de expresión en sistemas de transferencia transgénica de capacidad limitada, tales como vectores plasmídicos y vectores de AAV, se prefieren secuencias cortas. Se prefiere especialmente el elemento promotor MLC 260, que comprende el potenciador de CMV y una secuencia central específica de tejido cardíaco del promotor MLC y es solo de 850 pares de bases de largo (aprox. 45 600 del potenciador de CMV y aproximadamente 260 del promotor central).

50 La secuencia transcrita del primer elemento de secuencia comprende una secuencia de ADN que, cuando se transcribe por una ARN polimerasa en una célula, da lugar a un transcrito capaz de formar una estructura de horquilla parcialmente autocomplementaria que puede procesarse por la célula, proporcionando un producto de ARNip. Dicho producto de ARNip es típicamente un ARN bicatenario de 19 a 29 pares de bases de largo con superposiciones cortas en el extremo 3', capaz de degradar un ARNm en dicha célula. Según la invención, la estructura de horquilla y el producto de ARNip resultante son al menos parcialmente complementarios con una sección de la secuencia de ARNm de fosfolambano sintetizado en esa célula.

Específicamente, según un aspecto de la invención, una secuencia transcrita o primer elemento de secuencia conduce a la transcripción de una molécula de ARNip basado en microARN (miARNip) que puede procesarse por la célula, proporcionando una molécula de ARNip orientada a ARNm de PLB.

5 En el contexto de la presente invención, “un promotor que es operativo por una ARN polimerasa” significa que la presencia de la secuencia promotora caracterizada como “un promotor” es conocido que conduce al agrupamiento de los factores celulares necesarios y al agrupamiento e iniciación de la transcripción de dicha ARN polimerasa. “Ligado operativamente” en el contexto de esta memoria descriptiva significa que la secuencia promotora y la secuencia transcrita están ligadas de tal modo que el promotor, en condiciones fisiológicas, conducirá a la transcripción de la secuencia transcrita. Por ello, un “promotor de Pol-II” en condiciones fisiológicas es capaz de
10 agrupar la ARN polimerasa II en la secuencia transcrita ligada operativamente al mismo, y conduce a la iniciación de la transcripción de esa secuencia transcrita.

Si el promotor es un promotor de Pol-II, la secuencia transcrita comprende preferiblemente elementos de secuencia adicionales que faciliten el procesamiento del transcrito derivado de Pol-II inicial por el aparato de corte y empalme de la célula, proporcionando una molécula de miARNip que es capaz de orientarse a ARNm de PLB y regular
15 negativamente la expresión de PLB en una célula en que se transcriba el módulo de expresión.

Como se ha mencionado, las secuencias de miARNip que se han empleado según la invención son SEQ ID NO 001, SEQ ID NO 002 y SEQ ID NO 003. Las bases de nº 6 a 26 de estas secuencias comprenden, cuando se transcriben a ARN, la parte del ARN de horquilla pequeño que formará después el ARNip maduro dirigido contra el ARNm diana. Estas secuencias están subrayadas a continuación, con su parte complementaria respectiva en el extremo 3' en
20 negrita:

mihi-hPL1 229 (SEQ ID NO 001): TGCTGTGTTG AGGCATTTCA ATGGTTGTTT TGGCCACTGA
CTGACAACCA **TTGATGCCTC AACA**

mihi-hPL2 301 (SEQ ID NO 002): TGCTGATACA GATCAGCAAG AGACATGTTT TGGCCACTGA

CTGACATGTC **TCTCTGATCT GTAT**

mihi-hPL3 214 (SEQ ID NO 003): TGCTGATGGT TGAGGCTCTT CTTATAGTTT TGGCCACTGA

CTGACTATAA **GAAGCCTCAA CCAT**

25 Son conocidas secuencias que sirven como señales para dirigir el procesamiento de moléculas de ARN por el aparato de corte y empalme de la célula. El corte y empalme está catalizado por el espliceosoma, que es un gran complejo de ARN-proteína compuesto por 5 ribonucleoproteínas nucleares pequeñas presentes en células eucarióticas. Son ejemplos de elementos de secuencia adicionales que facilitan el procesamiento del transcrito derivado de Pol-II inicial por el aparato de procesamiento y corte y empalme de la célula, proporcionando una molécula de ARNip madura, los sitios donantes de corte y empalme y aceptores de corte y empalme. Son ejemplos
30 de elementos de secuencia adicionales que facilitan el procesamiento del transcrito derivado de Pol-II inicial, y que se han empleado exitosamente en el contexto de la presente invención, la región flanqueante 5' miR (SEQ ID NO 004) y la región flanqueante 3' miR (SEQ ID NO 005). Se hace referencia a las secuencias transcritas que comprenden un elemento generador de ARNhp y sitios donantes y aceptores de corte y empalme para la liberación de ese elemento transcrito como miARNip (de micro-ARNip) en el contexto de la presente invención.

35 SEQ ID NO 004: ctggaggctt gctgaaggct gtagtctg

SEQ ID NO 005: aggcacaag gcctgtact agcactcaca tgaacaat gccc

Se muestra en la SEQ ID NO 006 una secuencia transcrita que comprende una secuencia de iniciación de la transcripción para Pol-II y la región transcrita (la hebra +), incluyendo sitios donantes y aceptores de corte y empalme y el elemento de ARNhp.

40 Según un aspecto de la invención, la transcripción de la secuencia transcrita puede efectuarse por un promotor de ARN polimerasa II (Pol-II). Es uno de dichos promotores el promotor temprano inmediato de citomegalovirus, al que se hace referencia comúnmente como promotor de CMV. Son otros promotores empleados comúnmente el promotor de virus de simio 40 (SV40), el promotor de virus de sarcoma de Rous (RSV) y el promotor EF1α. Según un aspecto de la invención, se prefiere un promotor de Pol-II que sea específico de cardiomiocitos. “Específico” en el contexto
45 de la presente invención significa que se transcribe en cardiomiocitos un módulo de expresión, que comprende el promotor que es específico de cardiomiocitos y el primer elemento de secuencia ligado operativamente al mismo, a una velocidad significativamente más rápida que en otros tipos celulares. Son un ejemplo de promotor específico de cardiomiocito las secuencias MLC1500 (SEQ ID No 007) MLC800 (SEQ ID No 008) (Muller *et al.* 2006, Cardiovascular research, 70, 70-78) y MLC260 (SEQ ID No 009).

50 Según otro aspecto de la invención, se prefiere un promotor de Pol-II condicional que pueda inducirse en el paciente, preferiblemente mediante la administración de un compuesto farmacéutico de molécula pequeña. Es un ejemplo de

dicho promotor condicional el sistema transactivador de tetraciclina revisado por Gossen y Bujard (Ann. Rev. Genet. 2002, 36: 153-73). En este sistema de "tet-on", la expresión génica se regula por la presencia de tetraciclina o doxiciclina mediante unión de la proteína transactivadora de tetraciclina a elementos de respuesta de tetraciclina en el ADN. Un promotor condicional en el contexto de la presente memoria descriptiva significará un promotor cuya actividad puede aumentarse significativamente modificando directa o indirectamente un parámetro extrínseco a la célula en que el promotor es activo. Son ejemplos no limitantes de dichos promotores condicionales los promotores con diferentes actividades dependientes de la concentración de un fármaco de molécula pequeña, o dependientes de la temperatura de la célula o de la fuerza iónica de un ión específico en la célula o sus alrededores.

Se muestra en la SEQ ID NO 010 una secuencia que comprende el promotor condicional del sistema tet-on y una secuencia transcrita que proporciona una molécula de miARNiphp de PLB y que comprende el constructo del promotor TRE-tight1 (Sipo *et al.* 2006, JMM, 84: 215-225). En la misma, las bases 1-252 comprenden el sitio TetO7, las bases 253-314 son la secuencia promotora mínima de CMV, siendo la base 306 (timina) el presunto sitio de inicio de la transcripción, y de la base 394 a 453 el miARNiphp de PLB flanqueado por la región flanqueante 3' miR, la región flanqueante 5' miR y la secuencia de poliadenilación de SV40.

De forma similar, puede emplearse un promotor TRE-tight2 como se describe por Sipo *et al.* (como se cita anteriormente).

Según otro aspecto de la invención, el módulo de expresión se administra a un paciente en forma de un vector vírico. Según un aspecto de la invención, se usa un adenovirus para mediar la transferencia del módulo de expresión para la expresión de una molécula de ARN para regulación negativa de PLB en una célula. Se prefiere un adenovirus de tipo 5. Ciertos subtipos de adenovirus son conocidos por exhibir tropismo por células de músculo cardíaco y pueden emplearse por tanto para transferir el módulo de expresión de la invención a cardiomiocitos. El adenovirus de tipo 5 es un ejemplo de virus que exhibe tropismo a tejido cardíaco.

Son conocidos en la materia los procedimientos y protocolos experimentales para producir viriones adenovíricos que comprenden un módulo de expresión con fines terapéuticos o de vacunación (para una revisión actual, véase Bangari y Mittal, Curr. Gene Ther. abril de 2006; 6(2): 215-26). Los vectores adenovíricos pueden producirse mediante transfección de un ADN adenovírico en una línea celular auxiliar (por ejemplo, HEK 293) que exprese proteínas adenovíricas (por ejemplo, E1A, E1B) que no puedan expresarse a partir del genoma adenovírico, ya que los genes respectivos se eliminaron del genoma. Un vector adenovírico en el contexto de la presente memoria descriptiva significa por tanto una secuencia de ADN que comprende un módulo de expresión como se especifica anteriormente, que comprende los siguientes elementos:

- un promotor operativo en una célula de miocardio de mamífero,
- un primer elemento de secuencia transcrito que comprende una secuencia generadora de un miARNip que, tras transcripción, dará lugar a un transcrito de ARN que puede procesarse por el aparato de procesamiento de ARN celular hasta un ARNip dirigido contra ARNm de PLB, y
- las secuencias derivadas de virus necesarias para efectuar el empaquetamiento de la secuencia de ADN en partículas de virión por una línea celular de empaquetamiento adecuada para la producción de viriones adenovíricos defectivos de replicación que contienen el módulo de expresión.

Según otro aspecto de la invención, se usa un virus adenoasociado (AAV) para mediar la transferencia del módulo de expresión para la expresión de una molécula de ARN para regulación negativa de PLB en una célula. Los AAV son no patogénicos y conducen a pocas o ninguna reacción inmunitaria contra ellos. La expresión de transgenes de expresión portados por AAV es estable durante un largo periodo de tiempo.

Ciertos subtipos de AAV son conocidos por exhibir tropismo por células de músculo cardíaco y pueden emplearse por tanto para transferir el módulo de expresión de la invención a cardiomiocitos. AAV9 es un ejemplo de un virus que exhibe tropismo a tejido cardíaco.

Los vectores AAV9 se producen mediante procedimientos de cotransfección. El genoma vectorial comprende las secuencias de ITR (repetición terminal inversa) de AAV2 o secuencias de ITR de otros AAV adyacentes al módulo de expresión para la expresión de los transgenes (plásmido: UFCMV-MLC800-Intron-misiPLBh-pA). El genoma de AAV se empaqueta en una cápsida de AAV9 (plásmido: p5E18-VD2/9; contiene el gen AAV-Rep2 + el gen CAP9 de AAV, un amable obsequio del Dr. Wilson, University of Pennsylvania, EE.UU.). Las proteínas adicionales esenciales para el empaquetamiento derivan del plásmido 3 (por ejemplo, E1A, ARN-AV de adenovirus). Las partículas vectoriales de AAV se producen en células de cultivo y se liberan del cultivo celular mediante tres ciclos de congelación/descongelación y centrifugación en gradiente de cesio (Grimm: Methods (2002), 28, 146-157). Se muestra un ejemplo de genoma vectorial de AAV que contiene el módulo de expresión de miARNiphp de PLB regulado por tetraciclina en la SEQ ID NO 011 (para el diagrama vectorial, véase la Fig. 1).

Pueden producirse AAV como vectores de AAV monocatenarios o autocomplementarios (ac). Un vector de AAVac contiene una pequeña mutación en un sitio de resolución terminal, haciendo posible empaquetar un genoma

vectorial dimérico. Se muestra un ejemplo de un vector de AAVac que comprende un constructo de miARNip de la invención capaz de regular negativamente el ARNm de fosfolambano en la SEQ ID NO 012 (AAVac-CMV800 misiPLBh)

5 Según una realización preferida, se muestra en la SEQ ID NO 011 un módulo de expresión que comprende un miARNip para la generación de una molécula de ARNip orientada a la expresión de PLB, bajo el control de un sistema promotor condicional tet-on y que comprende elementos de secuencia de empaquetamiento para empaquetar el módulo de expresión en un vector de AAV.

10 Según aún otro aspecto de la presente invención, se proporciona un virión de virus adenoasociado que comprende el módulo de expresión del párrafo anterior. Preferiblemente, este virión es un virión de AAV de tipo 9 (AAV9). De forma similar, se proporciona una composición para el tratamiento de cardiomiopatía que comprende un módulo de expresión como se da a conocer en el párrafo anterior, o un virión como se da a conocer en este párrafo. Dicho virión puede obtenerse cotransfectando un módulo de expresión adecuado como el módulo de expresión del párrafo anterior o, específicamente, un módulo de expresión como se ejemplifica por la SEQ ID NO 011, en una línea celular adecuada, junto con un plásmido que contiene los elementos para empaquetar el módulo de expresión en viriones de AAV9.

15 Son conocidos en la materia los procedimientos y protocolos experimentales para producir viriones de virus adenoasociados que comprenden un módulo de expresión con fines terapéuticos o de vacunación (Grimm, *Methods*, 28, 146-157). Un vector de AAV en el contexto de la presente memoria descriptiva significa por tanto una secuencia de ADN que comprende un módulo de expresión como se especifica anteriormente, que comprende un promotor operativo en una célula de miocardio de mamífero, una secuencia transcrita que comprende un transcrito de ARN generador de miARNip capaz de dar lugar a un ARNip dirigido contra ARNm de PLB, y las secuencias derivadas de virus adenoasociado necesarias para efectuar el empaquetamiento de la secuencia de ADN en una línea celular de empaquetamiento adecuada para la producción de partículas víricas de AAV que contienen el módulo de expresión.

20 Según aun otro aspecto de la presente invención, se proporciona un promotor condicional mejorado para uso en un módulo de expresión que controla la transcripción de ARN de horquilla pequeño que puede procesarse hasta ARNip en la célula. El sistema tet-on actualmente en uso consiste en un promotor de CMV que activa la expresión de una proteína transactivadora de tetraciclina recombinante (rtTA), que a su vez se une a elementos de respuesta a tetraciclina (TRE) más adelante en la misma hebra de ADN, conduciendo a la expresión de una secuencia transcrita bajo el control de TRE. En teoría, la transcripción de la secuencia transcrita procede solo cuando está presente tetraciclina o doxiciclina. Sin embargo, el sistema padece, por experiencia, de expresión constitutiva en ausencia del fármaco inductor, probablemente debido a que el promotor de CMV muy fuerte "lee" toda la secuencia más adelante y produce un transcrito que incluye la secuencia generadora de miARNip más adelante, conduciendo por tanto a la producción de miARNip a partir del promotor de CMV en lugar de elementos TRE controlados por fármaco. Por otro lado, la inespecificidad del elemento TRE puede inhibirse por el reemplazo del promotor mínimo de CMV (CMVmin) por otro promotor no inespecífico tal como tight2 (véanse anteriormente los detalles de secuencia y datos de secuencia contenidos en la presente memoria), pero también mediante el uso de un silenciador transcripcional controlado por tetraciclina (tTS) que se une a TetO7 y reprime CMVmin (Fechner *et al.* 2003, *Gene Therapy*, 2003, 10, 1680-1690).

25 Según la invención, este problema puede evitarse intercambiando el promotor de CMV que activa la expresión de la proteína rtTA por un promotor menos activo específico de célula tal como MLC260 (SEQ ID NO 009).

Según otra realización preferida, se proporciona un módulo de expresión que comprende un elemento transcrito para la generación de una molécula de miARNip orientada a la expresión de PLB, bajo el control de un promotor específico de cardiomiocitos en un vector de empaquetamiento de AAV.

30 Un vector de AAV en el contexto de la presente memoria descriptiva es la realización preferida de la invención. Comprende una secuencia de ADN, una secuencia polinucleotídica como se especifica anteriormente que comprende los siguientes elementos:

- 35 – un promotor operativo en una célula de miocardio de mamífero, preferiblemente un promotor específico de miocardio, más preferiblemente un promotor condicional específico de miocardio tal como el sistema tet-on bajo el control del promotor MLC260,
- 50 – un primer elemento de secuencia transcrito que comprende una secuencia generadora de miARNip que, tras la transcripción, dará lugar a un transcrito de ARN que puede procesarse por el aparato de procesamiento de ARN celular hasta un ARNip dirigido contra ARNm de PLB, y
- las secuencias derivadas de virus necesarias para efectuar el empaquetamiento de la secuencia de ADN en partículas de virión por una línea celular de empaquetamiento adecuada para la producción de viriones de AAV defectivos de replicación, preferiblemente viriones de AAV9, que contienen el módulo de expresión.

5 Como alternativa según aún otra realización de la invención, el módulo de expresión para la expresión de una molécula de ARN para regulación negativa de PLB en una célula puede aplicarse al paciente como ADN desnudo o como ADN en asociación con un agente de transferencia no vírico, por ejemplo encapsulado en liposomas o en asociación con reactivos de poliamina tales como polietilenimina. Los módulos de expresión en asociación con un virus, con un agente de transferencia no vírico o como ADN desnudo, pueden aplicarse mediante inyección intravenosa, inyección intramuscular, transferencia génica mediada por partícula o cualquier otro procedimiento de transferencia adecuado.

10 Según aún otro aspecto de la presente invención, puede combinarse un constructo de expresión que expresa un constructo de ARN inhibidor tal como se describe anteriormente con un constructo de expresión que facilite una expresión aumentada de SERCA. Los procedimientos para expresar polipéptidos en células humanas son bien conocidos en la materia, e incluyen los procedimientos de transferencia vírica, liposómica y de ADN desnudo discutidos anteriormente. El ARNm puede expresarse a partir de secuencias de codificación de SERCA bajo el control de promotores de Pol-II tales como promotores de CMV o inducibles o específicos de célula, como se discute anteriormente. El ARNm de SERCA está publicado como la entrada a GeneBank NM_170665.

15 Según el aspecto anteriormente mencionado de la invención, puede localizarse un constructo de expresión que codifica SERCA en la misma secuencia polinucleotídica que el constructo que conduce a la regulación negativa de fosfolambano. Puede estar también separado del último y empaquetado en el mismo o distintos viriones, o asociado con partículas liposómicas o catiónicas junto con el constructo generador de ARNhp específico de fosfolambano.

20 Los pacientes en el contexto de esta invención pueden ser seres humanos, sin embargo es evidente que la invención puede aplicarse también a animales superiores tales como perros o caballos, así como primates.

Según otro aspecto de la invención, la secuencia de SEQ ID NO 009 puede usarse para activar la transcripción de cualquier transgén, por ejemplo un gen terapéutico tal como SERCA, un constructo de ARN o cualquier otra secuencia transcrita de forma específica de célula cardíaca.

25 La Fig. 1 muestra un diagrama vectorial de un vector plasmídico para empaquetamiento en viriones de AAV, que contiene un módulo de expresión que comprende un promotor condicional específico de célula cardíaca (tet-on) y un constructo de miARNip orientado a ARNm de fosfolambano. La secuencia del vector se da en la SEQ ID NO 011.

La Fig. 2 muestra un diagrama vectorial de un vector plasmídico para empaquetamiento en viriones de AAV, que contiene un módulo de expresión que comprende un promotor específico de célula cardíaca y un constructo de miARNip orientado a ARNm de fosfolambano. La secuencia del vector se da en la SEQ ID NO 012.

30 La Fig. 3 muestra los resultados experimentales de la expresión de ARNhp frente a ARNm de fosfolambano en células que expresan un constructo de fusión de fosfolambano-GFP. Específicamente, las Fig. 3 a y b muestran los resultados de transferencia Western, la Fig. 3c muestra la eficacia de inhibición de la expresión como relaciones de la evaluación densitométrica de las transferencias Western.

35 La Fig. 4 muestra transferencias Northern con transcritos de ARN radiactivos transferidos frente a ARNm de PLB de células de miocardio (véase el ejemplo 2). Carriles 1-4: control positivo, ARNhp adenovírico anti-PLB transcrito a partir de un promotor U6 como se publicó anteriormente (Fechner *et al.* 2006 "Gene Therapy. Highly efficient and specific modulation of cardiac calcium homeostasis by adenovector-derived short hairpin RNA targeting PLB". DEU: 10.1038); carriles 1,2: cardiomiocitos de rata recién nacida infectados con partículas de AdV purificadas por gradiente de cloruro de cesio que expresan ARNhp de PLB de rata a partir de U6 (promotor de polimerasa III); carriles 3, 4: cardiomiocitos de rata recién nacida infectados con un lisado de células HEK 293T que contiene partículas de AdV que expresan ARNhp de PLB de rata a partir de un promotor de polimerasa III; carriles 5-8: cardiomiocitos de rata recién nacida infectados con un lisado de células HEK 293T con partículas de AdV que expresan miARNiphp de PLB de rata con y sin doxiciclina; carriles 9-12: control negativo, cardiomiocitos de rata recién nacida infectados con un lisado de células HEK 293T con partículas de AdV que expresan ARNhp desordenado con y sin doxiciclina; carriles 13, 14: constructo de cardiomiocitos de rata recién nacida (no tratado) con y sin doxiciclina; carriles 9-12: control negativo (vector sin constructo de miARNip).

45 La Fig. 5 muestra los resultados de un experimento de desactivación génica de la expresión de ARNm de PLB por suministro de miPLBip de rata mediado por AAVac (vector scAAV2.6ac) en miocitos cardíacos de rata recién nacida. El panel superior muestra los resultados 5 días después de la transducción del vector (p.t.), el panel inferior los resultados 10 días p.t. Tres carriles muestran cada uno las transferencias Northern de células no tratadas, células tratadas con scAAV2.6-beta-shPLBr (carriles 4-6), células tratadas con scAAV2.6-CMV-misiPLBr (carriles 7-9) y células tratadas con scAAV2.6-MLC260-misiPLBr (carriles 10-12). Los carriles 1-3 son células de control no tratadas.

Ejemplos

Ejemplo 1: La expresión de miARNip regula negativamente la expresión de PLB humano en células cos7.

55 Se cotransfectaron células cos7 con un plásmido que expresa un transcrito de fusión GFP-PLB humano (Fechner *et al.* 2006 "Gene Therapy. Highly efficient and specific modulation of cardiac calcium homeostasis by adenovector-

derived short hairpin RNA targeting PLB". DEU: 10.1038). Se recogieron las células 48 h después y se analizó por análisis de transferencia Western la expresión de GFP. Todos los miARNiPhp de PLB humanos exhibieron una expresión de GFP regulada negativamente de manera dependiente de la dosis, indicando que la expresión del constructo de fusión se silenciaba por el constructo de miARNiPhp de PLB. Véase la Fig. 3.

5 Ejemplo 2: Desactivación génica de PLB mediada por adenovirus mediante la expresión de miARNiPhp de PLB

Se transdujeron cardiomiocitos de rata recién nacida con los respectivos vectores adenovíricos o lisado celular de HEK293 que contenía partículas adenovíricas durante 2 h, se reemplazó el medio y se añadió medio reciente. Se aisló el ARN total 4 días después y se investigó la expresión de ARNm de PLB por transferencia Northern. Se dan los resultados (transferencia Northern) en la Fig. 4: los vectores adenovíricos que expresan ARNhp de PLB de rata suprimían fuertemente la expresión de ARNm de PLB. Se encontró una eficacia de silenciamiento similar con el vector de expresión de miARNiPhp de PLB R4-misiPLBr-SV40. Sin embargo, se observó silenciamiento de PLB en presencia y ausencia de doxiciclina (Dox), indicando una probable inespecificidad o agotamiento de polimerasa a partir del promotor de CMV previo. Se usaron vectores adenovíricos que expresan un miARNip de control (R4-misineg-SV40) como control.

Se observa un experimento similar en la Fig. 5: se produjeron vectores de AAV autocomplementarios (ac) que expresan ARNhp de PLB (acAAV2.6-PLBr) en células 393T mediante cotransfección de plásmidos lanzadera de AAVac derivados de AAV2 y un plásmido de empaquetamiento de AAV6. Se liberaron los vectores recién generados mediante tres ciclos de congelación-descongelación y se limpiaron por centrifugación en gradiente de iodixanol. Se determinó la concentración del vector por transferencia Southern.

En paralelo, se construyeron nuevos vectores scAAV2.6 que expresan miPLBipr. Estos vectores contienen el promotor específico de corazón MLC260 o CMV para la transcripción de miPLBip (scAAV2.6 CMV-misiPLBr y scAAV2.6 MLC-misiPLBr, resp.). Los vectores diferentes de scAAV2.6-shPLBr se liberaron mediante tres ciclos de congelación/descongelación. Después de la sedimentación del lisado celular bruto, se usó directamente el sobrenadante que contenía vector para la transducción de miocitos cardíacos de rata recién nacida.

Se aislaron miocitos cardíacos de rata recién nacida y se cultivaron durante 48 h. Se infectaron las células con 5000 genomas vectoriales por célula (scAAV2.6-shPLBr) y 500 μ l/pocillo (1,2 millones de células) de scAAV2.6 CMV-misiPLBr y scAAV2.6 MLC-misiPLBr, resp. durante 24 h. Se aisló el ARN 5 y 10 días después y se determinó la expresión de ARNm de PLB por transferencia Northern.

Resultados: Los vectores de AAV que expresan miPLBip eran capaces de desactivar génicamente la expresión de ARNm de PLB (hibridación por transferencia Northern, Fig. 5) 5 y 10 días después de la transducción. La eficacia de miPLBipr activado por ambos promotores CMV y MLC era mayor que para PLBhpr activado por el promotor U6 en scAAV2.6-shPLBr (que era capaz de silenciar la expresión de PLB en experimentos publicados, véase Fechner *et al.*, *ibid.*).

Conclusión: Puede expresarse miPLBipr a partir de promotores de polimerasa II (CMV y MLC) de manera específica de tejido (MLC) y es más eficaz que ARNhp de PLB en la desactivación génica de PLB.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Charité Universitätsmedizin Berlin Freie Universität Berlin
- <120> Secuencia polipeptídica para la inhibición de la síntesis de fosfolambano
- 40 <130> IPA135WO
- <160> 13
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 64
- 45 <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1

	tgctgtgttg aggcatttca atggttgttt tggccactga ctgacaacca ttgatgcctc	60
	aaca	64
	<210> 2	
	<211> 64	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 2	
	tgctgataca gatcagcaag agacatgttt tggccactga ctgacatgtc tctctgatct	60
	gtat	64
	<210> 3	
	<211> 64	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 3	
	tgctgatggt tgaggctctt ottatagttt tggccactga ctgactataa gaagcctcaa	60
	ccat	64
	<210> 4	
15	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> región de consenso flanqueante 5' de la secuencia de microARN en el transcrito del que se libera el miARN	
20	<400> 4	
	ctggaggctt gctgaaggct gtatgctg	28
	<210> 5	
	<211> 45	
	<212> ADN	
25	<213> artificial	
	<220>	
	<223> región de consenso flanqueante 3' de la secuencia de microARN en el transcrito del que se libera miARN	
	<400> 5	
	aggacacaag gcctgttact agcactcaca tggaacaaat ggccc	45
30	<210> 6	
	<211> 422	

<212> ADN

<213> artificial

<220>

5 <223> Una secuencia transcrita que comprende una secuencia de iniciación de la transcripción de Pol-II y la región transcrita (la hebra +) incluyendo los sitios donante y aceptores de corte y empalme y el elemento de ARNhp

<400> 6

```

cagatcgctt ggagaattcg agctcggtag cccggaggta gtgagtcgac cagtggatcc      60
tggaggcttg ctgaaggctg tatgctgata cagatcagca agagacatgt tttggccact      120
gactgacatg tctctctgat ctgtatcagg acacaaggcc tgttactagc actcacatgg      180
aacaatggc ccagatctgg ccgcatcgag atcgacgcgt gctagaggat cataatcagc      240
cataccacat ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaacc tcccacacct ccccctgaac      300
ctgaaacata aatgaatgc aattggtgtt gttaacttgt ttattgcagc ttataatggt      360
tacaataaaa gcaatagcat cacaaatttc acaaataaag cttttttttc actgcctcta      420
gc                                                                                   422

```

<210> 7

<211> 2093

10 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 7

```

ggtaccgcgg tggcggccgc ttcgagctcg cccgacattg attattgact agttattaat      60
agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac      120
ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa      180
tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt      240
atctacggta aactgcccac ttggcagtag atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc      300
ctattgacgt caatgacggt aatggcccg cctggcatta tgcccagtag atgaccttat      360
gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcac cgctattacc atggtgatgc      420
ggttttgga gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc      480
tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aatcaacgg gactttccaa      540
aatgctgtaa caactccgcc ccatgcggcc gctctagcta gccttgaact cactatgtag      600

```

ES 2 465 190 T3

gcaagcatga ccatgaactt ctgatcctcc ttcctcagtg tcctgggata acaggtgtgt 660
gtcactccct acccttctaa tagcaatatg tggccacatg tttgtgcccc acaggttgag 720
accatcttga cctgaggaag aatagctaa cactcacctc ctgaaggttg cctggatctc 780
gtctttgtct ttccagcact caggagtggg ggggtcagaa gtgcaaagtc agcccctgct 840
acataatgag ttcaaggctc gcctgggcta catgagacca tgcctcaaaa agaaaaggaa 900
ttggtatagt gacatactct ggtcctccca gtacttaggg acacagaggc cactccacca 960
ccatctccag cagctggcct gcctccccga gcctcgttta tttcatatca atgagatggg 1020
gacccaactg ctaaggtgac cttgcaccca cggggtgact ggagacttga gagtggaggg 1080
tttatcattt ctccagtcgg tcagcaagtg gtcgccgcca agaaggtttt gagttaaag 1140
tagaagatgg gacagggaga gaccagcgag aagacccac cctggagctg actgtccctg 1200
tgcggctggg tggggacaca aagcagagaa gcagaggcag agaacaaggg tgggtgacat 1260
ttgagcaagg atgggggtgt gccagaggct gcccaagatg cataggtgca aaggccctga 1320
ggttcgagga tgcctggatc cggaatcaaa gctcaggtc ctccctcttc ctccctcc 1380
totgccccct cctcctctc tgccccctct tctcctctg ccccccttc ttctcctcc 1440
tcttctcct cccctcctca tctacctct tctcctctc ctccccctcc tcttctcct 1500
ctgccccctc ttctcctcc tctcttctct cctcctcttc ctctcccct cctcatctac 1560
ctccttctcc tctcctccc cctcctcttc ctctctgcc cctcttctct cctctgcccc 1620
tcttctcct cctcctcttc ctctctgcc cctcctccc cctcctcttc ctcttctcc 1680
tccccctctc atctacctcc ttctcttct cctcttcttc ctctctttc tctcctcct 1740
ccctctctc ttctcctcc tcttctttct cctcctctc ttctcccc tccccttct 1800
gggttacttt tccccattag acaatggcag gaccagagc acagagcatc gttcccaggc 1860
caggccccag ccactgtctc tttaacctg aaggcatttt tgggtctcac gtgtccaccc 1920
aggcgggtgt cggactttga acggctctta cttcagaaga acggcatggg gtgggggggc 1980
ttaggtggcc totgcctcac ctacaactgc caaaagtggc catgggggta tttttaaccc 2040
caggaagag gtatttattg ttccacagca ggggccggcc agcaggctcc ttg 2093

<210> 8

<211> 1331

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

ES 2 465 190 T3

cggtagccgcg gtggcggccg cttcgagctc gcccgcacatt gattattgac tagttattaa 60
 tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata tggagttccg cgttacataa 120
 cttacggtaa atggcccgcg tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata 180
 atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca atgggtggag 240
 tatttacggt aaactgccc a ttggcagta catcaagtgt atcatatgcc aagtaogccc 300
 cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta catgacctta 360
 tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac catggtgatg 420
 cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg atttccaagt 480
 ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg ggactttcca 540
 aaatgtcgta acaactccgc cccatgcggc cgctctagcc ggaatcaaag ctcaggctcc 600
 tccctcttcc tctctctct ctgccccctc ctctctctct gccccctctt cctctctctc 660
 cccctcttct tctctctct ctctctctc cctctctcat ctacctctt ctctctctcc 720
 tccccctct ctctctctc tgccccctct tctctctct cctctctctc ctctcttcc 780
 tctctccctc ctcatctacc tcttctctct cctctctccc ctctcttcc tctctgccc 840
 cctcttctc ctctgcccct ctctctctc ctctcttcc tctctgccc cctctctccc 900
 ctctcttcc tcttctctct cccctctca totacctct tctctctc ctctcttcc 960
 tctctttct cctctctct cctctctct tctctctct ctctttctc ctctctctct 1020
 tctctcccct ccccttctg gggtactttt cccattaga caatggcagg acccagagca 1080
 cagagcatcg ttcccaggcc aggcccagc cactgtctct ttaacctga aggcattttt 1140
 gggctctacg tgtccacca ggcgggtgct ggactttgaa cggctcttac ttcagaagaa 1200
 cggcatgggg tgggggggct taggtggcct ctgcctcacc tacaactgcc aaaagtggct 1260
 atggggttat ttttaacccc agggaagagg tatttattgt tccacagcag gggccggcca 1320
 gcaggtcct t 1331

<210> 9

<211> 827

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> longitud mínima del promotor específico de tejido cardiaco

<400> 9

ES 2 465 190 T3

gcggccgctt cgagctcgcc cgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta 60
 cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaattg 120
 gcccgccctgg ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac gtcaataatg acgtatgttc 180
 ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa 240
 ctgcccactt ggcagtacat caagtgtatc atatgccaaag tacgccccct attgacgtca 300
 atgacggtaa atggcccgcc tggcattatg cccagtacat gaccttatgg gactttccta 360
 cttggcagta catctacgta ttagtcatcg ctattacat ggtgatgcgg ttttggcagt 420
 acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccccattg 480
 acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttcacaaa tgtcgtaaca 540
 actccgcccc atgcggccgc tctaggacc cagagcacaga gcatcgttcc caggccaggc 600
 cccagccact gtctctttaa ccttgaaggc atttttgggt ctcacgtgtc caccagggcg 660
 ggtgtcggac tttgaacggc tcttacttca gaagaacggc atgggggtggg ggggcttagg 720
 tggcctctgc ctcacctaca actgcacaaa gtggtcatgg gggtattttt aaccccaggg 780
 aagaggtatt tattgttcca cagcaggggc cggccagcag gctcctt 827

<210> 10

<211> 728

5 <212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> Constructo del promotor TRE-Tight1 (Sipo *et al.* 2006, *JMM*, 84: 215-225) 1-252: TetO7; 253 -314: CMVmin;
 (t) 306: presunto sitio de inicio transcripcional; 394 - 453: miARNiph de PLB; subrayado, cursiva, 5'

10 <400> 10

ES 2 465 190 T3

gagtttactc cctatcagtg atagagaacg tatgtcagtg ttactcccta tcagtgatag 60
 agaacgatgt cgagtttact ccctatcagtg gatagagaac gtatgtcagag ttactccct 120
 atcagtgata gagaacgtat gtcgagttta ctccctatca gtgatagaga acgtatgtcg 180
 agtttatccc tatcagtgat agagaacgta tgtcaggttt actccctatc agtgatagag 240
 aacgtatgtc gaggtaggcg tgtacggtgg gaggcctata taagcagagc tcgtttagtg 300
 aaccgtcaga tcgcctggag aattcgagct cggtagcccg gaggtagtga gtcgaccagt 360
 ggatcctgga ggcttgctga aggctgtatg ctgatacaga tcagcaagag acatgttttg 420
 gccactgact gacatgtctc tctgatctgt atcaggacac aaggcctgtt actagcactc 480
 acatggaaca aatggcccag atctggccgc atcgagatcg acgcgtgcta gaggatcata 540
 atcagccata ccacatttgt agaggtttta cttgctttaa aaaacctccc acacctcccc 600
 ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt gttgttgta acttgtttat tgcagcttat 660
 aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg 720
 cctctagc 728

<210> 11

<211> 6535

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> UFCMV-MLC800-Intron-misiPLBh-pA que comprende el CMV mínimo, micro-ITR de AAV SV40 pA anti-PLB

<400> 11

ES 2 465 190 T3

gggggggggg gggggggggg ccaactccctc tctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgg 60
 gcgaccaaag gtcgcccagc gcccgggctt tgcccggggc gcctcagtga gcgagcgagc 120
 gcgcagagag ggagtggcca actccatcac taggggttcc tagatctgaa ttcggtaccg 180
 cggtaggggc cgcttcgagc tcgcccagaca ttgattattg actagttatt aatagtaatc 240
 aattacgggg tcattagttc atagcccata tatggagttc cgcgttacat aacttacggt 300
 aatggcccg cctggctgac cgcccacga cccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta 360
 tgttcccata gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg 420
 gtaaaactgc cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc cccctattga 480
 cgtcaatgac ggtaaattggc ccgcctggca ttatgccag tacatgacct tatgggactt 540
 tcctacttgg cagtacatct acgtattagt catcgctatt accatgggtga tgcggttttg 600
 gcagtacatc aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttcaa gtctccaccc 660
 cattgacgtc aatgggagtt tgttttgca ccaaaatcaa cgggactttc caaaatgtcg 720
 taacaactcc gccccatgcg gccgctctag ccggaatcaa agctcaggct cctccctctt 780
 cctcctcctc ctctgcccc tctcctcct ctgccccctc ttctcctct gccccctctt 840
 ctctcctcct ctcttctctc tcccctcctc atctacctcc ttctcctcct cctccccctc 900
 ctcttctctc tctgccccct ctctcctcct cctctcttcc tctcctctt cctcctcccc 960
 tctcatcta cctccttctc ctctcctcct cctcctctt cctcctctgc cccctcttcc 1020
 tctctgccc ctcttctctc tctcctctt cctcctctgc cccctcctcc cctcctctt 1080
 cctcttctc ctccccctct catctacctc ctctcttcc tctcttctt cctcctctt 1140
 ctctcctcct tcccctctct ctctcctcct ctcttcttcc tctcctcct ctctcctccc 1200
 ctcccccttcc tgggttactt ttcccatta gacaatggca ggaccagag cacagagcat 1260
 cgttcccagg ccaggcccca gccactgtct cttaaacctt gaaggcattt ttgggtctca 1320
 cgtgtccacc caggcgggtg tcggactttg aacggctctt acttcagaag aacggcatgg 1380
 ggtggggggg cttaggtggc ctctgcctca cctacaactg ccaaaagtgg tcatgggggt 1440
 atttttaacc ccaggaaga ggtatttatt gttccacagc aggggcccgc cagcaggctc 1500
 cttgaatttc gaggaactga aaaaccagaa agttaactgg taagtttagt ctttttgtct 1560
 tttatttcag gtcccggatc cggtaggtgg gcaaatcaa gaactgctcc tcagtggatg 1620
 ttgcctttac ttctaggcct gtacggaagt gttacttctg ctctaaaagc tgcggaattg 1680
 taccgcgggc cgcccccaat tcgagctcgc ccgggatcc tctagaatgt caagactgga 1740
 caagagcaaa gtcataaacg gcgctctgga attactcaat ggagtcggta tcgaaggcct 1800

ES 2 465 190 T3

gacgacaagg aaactcgcctc aaaagctggg agttgagcag cctaccctgt actggcacgt 1860
gaagaacaag cgggccctgc tcgatgccct gccaatcgag atgctggaca ggcatcatac 1920
ccacttctgc cccctggaag gcgagtcag gcaagacttt ctgcggaaca acgccaagtc 1980
attccgctgt gctctcctct cacatcgca cggggctaaa gtgcatctcg gcacccgccc 2040
aacagagaaa cagtacgaaa ccctggaaaa tcagctcgcg ttctgtgtc agcaaggctt 2100
ctccctggag aacgcactgt acgctctgtc cgccgtgggc cactttacac tgggctgcgt 2160
attggaggaa caggagcatc aagtagcaaa agaggaaaga gagacaccta ccaccgattc 2220
tatgccccca cttctgagac aagcaattga gctgttcgac cggcagggag ccgaacctgc 2280
cttccttttc ggcctggaac taatcatatg tggcctggag aaacagctaa agtgcgaaaag 2340
cggcgggccg gccgacgcc ttgacgattt tgacttagac atgctcccag ccgatgccct 2400
tgacgacttt gacctgata tgctgcctgc tgacgctctt gacgattttg acctgacat 2460
gctccccggg taactaagta aggatccgtc gacaagcttc tgtgccttct agttgccagc 2520
catctgttgt ttgccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc actcccactg 2580
tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtagtgt cattctattc 2640
tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg 2700
ctggggatgc ggtgggctct atggcttctg aggcggaaaag aaccagctgg ggtctagtcg 2760
aggccctttc gtcttcacac gagtttactc cctatcagtg atagagaacg tatgtcgagt 2820
ttactcccta tcagtgatag agaacgatgt cgagtttact ccctatcagt gatagagaac 2880
gtatgtcgag tttactccct atcagtgata gagaacgtat gtcgagtta ctccctatca 2940
gtgatagaga acgtatgtcg agtttatccc tatcagtgat agagaacgta tgtcgagttt 3000
actccctatc agtgatagag aacgtatgtc gaggtaggcg tgtacggtgg gaggcctata 3060
taagcagagc tcgtttagtg aaccgtcaga tcgcctggag aattcgagct cggtaccccg 3120
gaggtagtga gtcgaccagt ggatcctgga ggcttgctga aggctgtatg ctggaaatgt 3180
actgcgcgtg gagacgtttt ggccactgac tgacgtctcc acgcagtaca tttcaggaca 3240
caaggcctgt tactagcact cacatggaac aaatggcca gatctggccg catcgagatc 3300
gacgcgtgct agaggatcat aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta 3360
aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttgttgtt 3420
aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 3480
aataaagcat ttttttcaact gcctctagca aatcgataac tggggagaga tctaggaacc 3540
cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgcccc 3600
ggcaaagccc gggcgtcggg cgacctttg tgcgccggcc tcagtgagcg agcgagcgcg 3660

ES 2 465 190 T3

cagagagga gtggccccc ccccccccc ccctgcagc ccagctgcat taatgaatcg 3720
 gccaacgcgc ggggagaggc ggtttgcgta ttgggcgctc ttccgcttcc tcgctcactg 3780
 actcgctgcg ctcggtcggt cggctgcggc gagcggatc agctcactca aaggcggtaa 3840
 tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc 3900
 aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg ctccgcccc 3960
 ctgacgagca tcacaaaaat cgacgctcaa gtcagagggtg gcgaaaccgg acaggactat 4020
 aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtgcg ctctcctggt ccgaccctgc 4080
 cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt tctcaatgct 4140
 cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg 4200
 aacccccgt tcagcccagc cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gagtccaacc 4260
 cggtaaagaca cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga 4320
 ggtatgtagg cggtgctaca gaggttctga agtggtggcc taactacggc tacactagaa 4380
 ggacagtatt tggtatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaaaa agagttggta 4440
 gctcttgatc cggcaaacia accaccgctg gttagcgggtg tttttttggt tgcaagcagc 4500
 agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggctcg 4560
 acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga 4620
 tcttcaccta gatcctttta aattaataat gaagttttaa atcaatctaa agtatatatg 4680
 agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct 4740
 gtctatctcg ttcattccata gttgcctgac tccccgctgt gtagataact acgatacggg 4800
 agggcttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc 4860
 cagatttatc agcaataaac cagccagccg gaagggccga gcgcagaagt ggtcctgcaa 4920
 ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc 4980
 cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtgggtg tcacgctcgt 5040
 cgtttggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc aaggcgagtt acatgatccc 5100
 ccatggtgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggctcctcc gatcgttgtc agaagtaagt 5160
 tggccgcagt gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc 5220
 catccgtaag atgcttttct gtgactggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt 5280
 gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaataac ggataatacc gcgccacata 5340
 gcagaacttt aaaagtgctc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga 5400
 tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg tgcaccaaac tgatcttcag 5460
 catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa 5520
 aaaagggaaat aaggcgacga cggaaatggt gaatactcat actcttctt tttcaatatt 5580

ES 2 465 190 T3

```

attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatattgaa tgtatttaga 5640
aaaataaaca aatagggggt ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccacct gacgtctaag 5700
aaaccattat tatcatgaca ttaacctata aaaataggcg tatcacgagg ccctttcgtc 5760
tcgcgcgttt cggatgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca 5820
cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg 5880
ttggcgggtg tcggggctgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc 5940
accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcaggaaat 6000
tgtaaacgtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatatt tgttaaatca gctcattttt 6060
taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga ccgagatagg 6120
gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt 6180
caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaacat caccctaate 6240
aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag ggagcccccg 6300
atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaagga agaaagcgaa 6360
aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc 6420
cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gtcgcgccat tcgccattca ggctacgcaa 6480
ctggtgggaa gggcgatcgg tgcgggcctc ttcgctatta cgccagctgg ctgca 6535

```

<210> 12

<211> 4922

<212> ADN

5 <213> artificial

<220>

<223> promotor específico de corazón AAV2 MLC 800 SV40 pA

<400> 12

ES 2 465 190 T3

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc	60
gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca	120
actccatcac taggggttcc tgcggccgca gaattcggtta ccgcggtggc ggccgcttcg	180
agctcgcccc acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag	240
ttcatagccc atatatggag ttccgcgta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct	300
gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc	360
caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattht acggtaaact gccacttgg	420
cagtacatca agtgtatcat atgccaaagta cgtccccctat tgacgtcaat gacggtaaht	480
ggccccgctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca	540
tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc	600

gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga 660
 gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttocaaaatg tcgtaacaac tccgccccat 720
 gcggccgctc tagccggaat caaagctcag gctcctcctt cttcctcctc ctctctgccc 780
 cctcctcctt cctctgcccc ctcttctctc tctgccccct cttcttctct ctctcttccc 840
 tctcctcctc ctcatctacc tctttctctt cctcctcccc ctctcttccc tctctgcccc 900
 cctcttctct ctctcctctt tctcctcctt cttcctcctc cctcctctat ctacctcctt 960
 ctctcctctc tccccctcct cttcctcctc tgccccctct tctcctctct cccctcttcc 1020
 tctcctcctt attcctcctc tgccccctcc tccccctcct cttcctcttc ctctcctcct 1080
 cctcatctac ctcttctctt tctcctcttt cttcctcctc tttctctctc tctcctctct 1140
 cctcttctct ctctctttct ttctcctcct cctcttctct cccctccccct tcttgggtta 1200
 cttttcccca ttagacaatg gcaggacca gagcacagag catcgttccc aggccaggcc 1260
 ccagccactg tctctttaac cttgaaggca tttttgggtc tcacgtgtcc acccaggcgg 1320
 gtgtcggact ttgaacggct cttacttcag aagaacggca tgggggtgggg gggcttaggt 1380
 ggcctctgcc tcacctataa ctgccaaaag tggctatggg gttattttta accccaggga 1440
 agaggtatth attgttccac agcaggggccc ggccagcagg ctcttgaat ttcgaggaac 1500
 tgaaaaacca gaaagttaac tggttaagttt agtctttttg tcttttattt caggtcccgg 1560
 atccggtggt ggtgcaaact aaagaactgc tctcagtggt atgttgccct tacttctagg 1620
 cctgtacgga agtgttactt ctgctctaaa agctgcgga tttgtaccgc ggccgcccc 1680
 aattcgagct cgcgggggga tctctagag tcgacctgca gaagcttggg accccggagg 1740
 tagtgagtcg accagtggtt cctggaggct tgctgaaggc tgtatgctga tacagatcag 1800
 caagagacat gttttggcca ctgactgaca tgtctctctg atctgtatca ggacacaagg 1860
 cctgttacta gcactcacat ggaacaaatg gccagatct ggccgcatcg agatcgacgc 1920
 gtgctagagc tagaatcgat aagctagctt ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg 1980
 tttgccccct ccccgctcct tcttggacc cttggaaggtgc cactcccact gtccttctct 2040
 aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg 2100
 ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt ggaagacaa tagcaggcat gctggggatg 2160
 cgggtgggctc tatggcttct gaggcggaaa gaaccagctg gggctagag tcccactccc 2220
 tctctgcgcg ctcgctcgct cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc 2280
 tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagct gcctgcaggg gcgcctgatg 2340
 cggtatthtc tcttacgca tctgtgcggg atttcacacc gcatacgtca aagcaacct 2400
 agtacgcgcc ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga 2460
 ccgctacact tgccagcgcc ctagcgcccg ctcttctcgc tttcttccct tctttctctg 2520

ES 2 465 190 T3

ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat 2580
 ttagtgcttt acggcacctc gacccccaaa aacttgattt gggatgatggg tcacgtagtg 2640
 ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacggt ggagtcacag ttctttaata 2700
 gtggactcct gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctctgggctat tcttttgatt 2760
 tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggtaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat 2820
 ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt ttacaatttt atgggtgact ctcagtacaa 2880
 tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacacc gccaacacc gctgacgcgc 2940
 cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga 3000
 gctgcatgtg tcagaggttt tcaccgtcat caccgaaacg cgcgagacga aagggcctcg 3060
 tgatacgcct atttttatag gttaatgtca tgataataat ggtttcttag acgtcaggtg 3120
 gcacttttcg gggaaatgtg cgcggaacc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa 3180
 atatgtatcc gctcatgaga caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga 3240
 agagtatgag tattcaacat ttccgtgtcg cccttattcc cttttttgcg gcattttgcc 3300
 ttctgtttt tgctcaccga gaaacgctgg tgaaagtaaa agatgctgaa gatcagttgg 3360
 gtgcacgagt gggttacatc gaactggatc tcaacagcgg taagatcctt gagagttttc 3420
 gccccgaaga acgttttcca atgatgagca cttttaaagt tctgctatgt ggcgcgggat 3480
 tatcccgtat tgacgccggg caagagcaac tcggtcgccg catacactat tctcagaatg 3540
 acttggttga gtactcacca gtcacagaaa agcatcttac ggatggcatg acagtaagag 3600
 aattatgcag tgctgccata accatgagtg ataacactgc ggccaactta cttctgacaa 3660
 cgatcggagg accgaaggag ctaaccgctt ttttgacaaa catgggggat catgtaactc 3720
 gccttgatcg ttgggaaccg gagctgaatg aagccatacc aaacgacgag cgtgacacca 3780
 cgatgcctgt agcaatggca acaacgttgc gcaaactatt aactggcgaa ctacttactc 3840
 tagcttcccg gcaacaatta atagactgga tggaggcggg taaagttgca ggaccacttc 3900
 tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc ggtgagcgtg 3960
 ggtctcgcgg tatcattgca gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 4020
 tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc gctgagatag 4080
 gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat atactttaga 4140
 ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt tttgataatc 4200
 tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac cccgtagaaa 4260
 agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc ttgcaaaaa 4320
 aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttggt tgccggatca agagctacca actctttttc 4380

ES 2 465 190 T3

cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta gtgtagccgt 4440
 agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct ctgctaatacc 4500
 tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg gactcaagac 4560
 gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc acacagccca 4620
 gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta tgagaaagcg 4680
 ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg gtcggaacag 4740
 gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt cctgtcgggt 4800
 ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg cggagcctat 4860
 ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg cttttgctc 4920
 ac 4922

<210> 13

<211> 281

<212> ADN

5 <213> promotor artificial tight 2

<220>

<223> secuencia de promotor artificial

<400> 13

gtttactccc tatcagtgat agagaacgta tgtcgagttt actccctatc agtgatagag 60
 aacgatgtcg agtttactcc ctatcagtga tagagaacgt atgtcgagtt tactccctat 120
 cagtgataga gaacgtatgt cgagtttact ccctatcagt gatagagaac gtatgtcgag 180
 tttatcccta tcagtgatag agaacgtatg tcgagtttac tccctatcag tgatagagaa 240
 cgtatgtcga ggtaccggg tcgcctatat aagctggatc c 281

REIVINDICACIONES

1. Secuencia polinucleotídica de ADN que comprende
- a. un primer elemento de secuencia que, cuando se transcribe por una ARN polimerasa, conduce a la transcripción de un ARNip basado en microARN (miARNip) y da lugar a un transcrito capaz de formar una estructura de horquilla parcialmente autocomplementaria que puede procesarse por una célula de mamífero hasta un producto de ARNip capaz de degradar un ARNm en dicha célula, en el que el ARNm degradado por el producto de ARNip codifica fosfolambano,
 - b. una secuencia promotora ligada operativamente al primer elemento de secuencia, siendo operativa dicha secuencia promotora por una ARN polimerasa de origen natural en una célula de mamífero, en la que la secuencia promotora es un promotor específico de célula de cardiomiocito, y
 - c. una secuencia de empaquetamiento polinucleotídico de ADN derivado de virus;
- caracterizada porque** el miARNip comprende al menos una de las secuencias SEQ ID NO 001, SEQ ID NO 002 o SEQ ID NO 003.
2. Secuencia polinucleotídica de ADN según la reivindicación 1, **caracterizada porque** la secuencia promotora específica de célula cardiomiocito es un promotor de ARN polimerasa II.
3. Secuencia polinucleotídica de ADN según la reivindicación 1 o 2, **caracterizada porque** el promotor específico de célula cardiomiocito es al menos una de las secuencias SEQ ID NO 007, SEQ ID NO 008 o SEQ ID NO 009.
4. Secuencia polinucleotídica de ADN según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** el primer elemento de secuencia comprende adicionalmente elementos de secuencia que facilitan el procesamiento del transcrito por el aparato de corte y empalme de la célula.
5. Secuencia polinucleotídica de ADN según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende al menos una de las secuencias SEQ ID NO 004 y SEQ ID NO 005 y al menos una de las secuencias SEQ ID NO 007, SEQ ID NO 008 o SEQ ID NO 009.
6. Una secuencia polinucleotídica de ADN según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** la secuencia polinucleotídica de ADN derivado de virus es una secuencia de empaquetamiento de adenovirus.
7. Una secuencia polinucleotídica de ADN según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada porque** la secuencia polinucleotídica de ADN derivado de virus deriva de un virus adenoasociado.
8. Una secuencia polinucleotídica de ADN según la reivindicación 7, **caracterizada porque** la secuencia polinucleotídica de ADN derivado de virus deriva de un virus adenoasociado de tipo 9.
9. La secuencia polinucleotídica de ADN de SEQ ID NO 010 o SEQ ID NO 011 o SEQ ID NO 012.
10. Una partícula vírica que contiene una secuencia polinucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
11. Una célula eucariótica aislada que contiene una secuencia polinucleotídica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
12. Una célula eucariótica aislada según la reivindicación 11, en la que la célula es una célula de mamífero.
13. Una composición para su uso en el tratamiento de cardiomiopatía que comprende:
- a. una secuencia polinucleotídica, una partícula vírica y/o una célula de mamífero aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y
 - b. un excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. Una composición para su uso en el tratamiento de cardiomiopatía que comprende:
- c. una secuencia polinucleotídica o una partícula vírica o una célula de mamífero aislada según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y
 - d. una secuencia polinucleotídica de ADN o una partícula vírica que comprende un módulo de expresión que comprende una segunda secuencia promotora operativa en un cardiomiocito y un segundo elemento de secuencia que codifica SERCA (Ca^{2+} -ATPasa de retículo sarcoendoplásmico) ligado operativamente con dicha segunda secuencia promotora, y
 - e. un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1

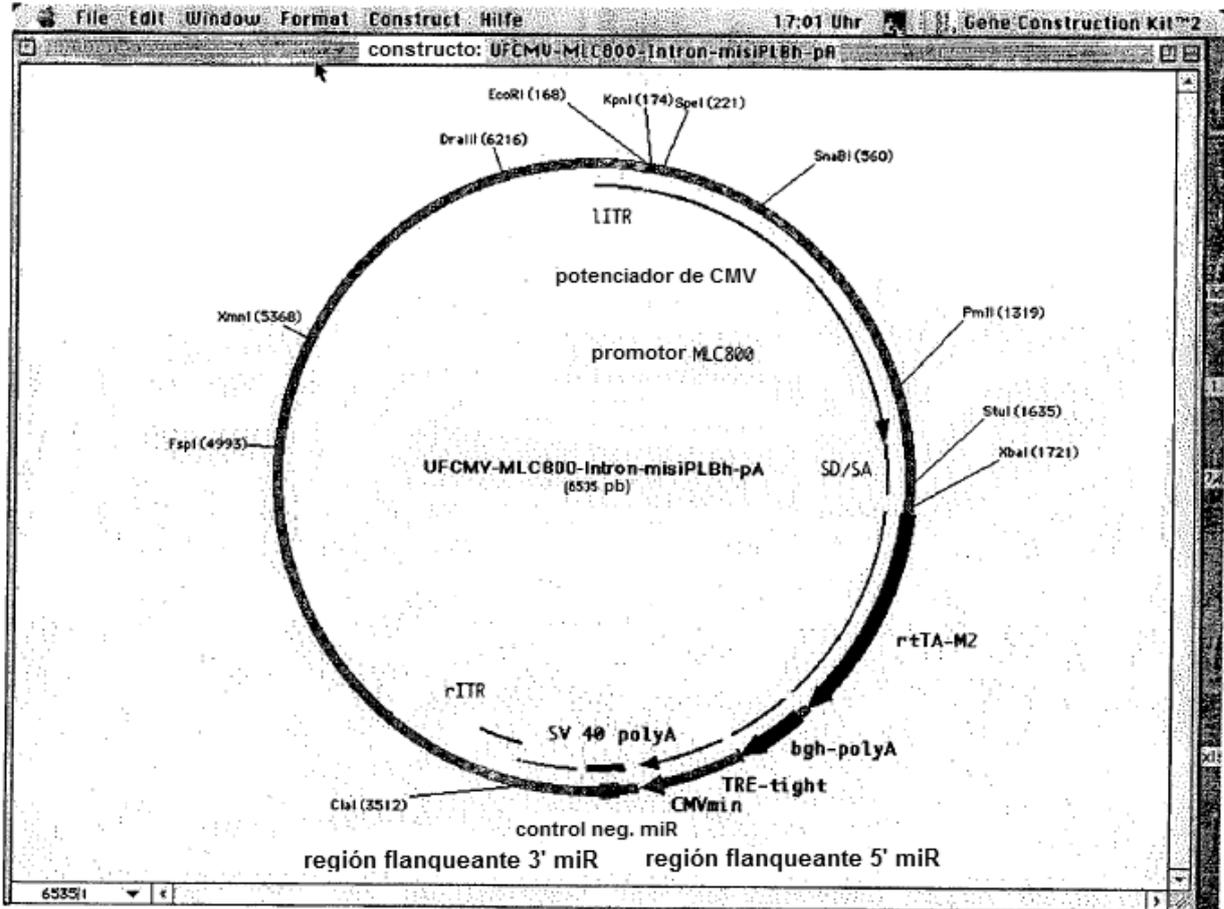


Fig. 2

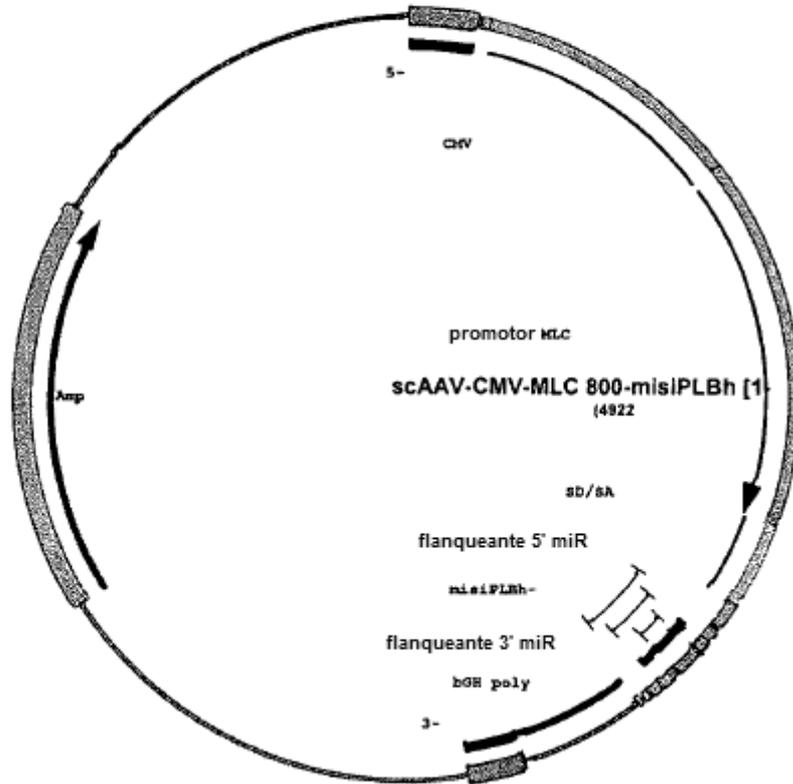
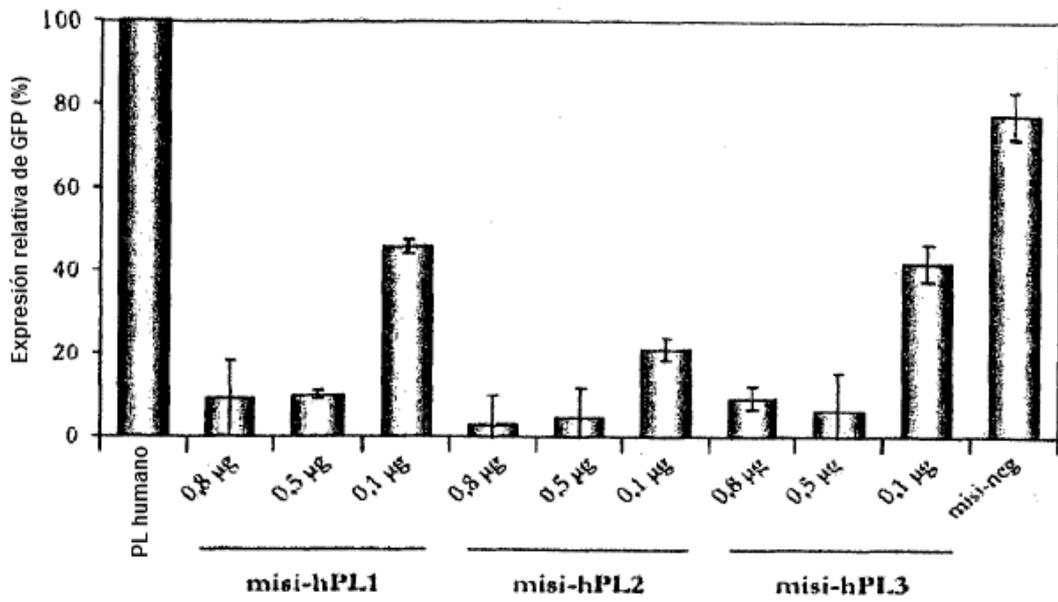
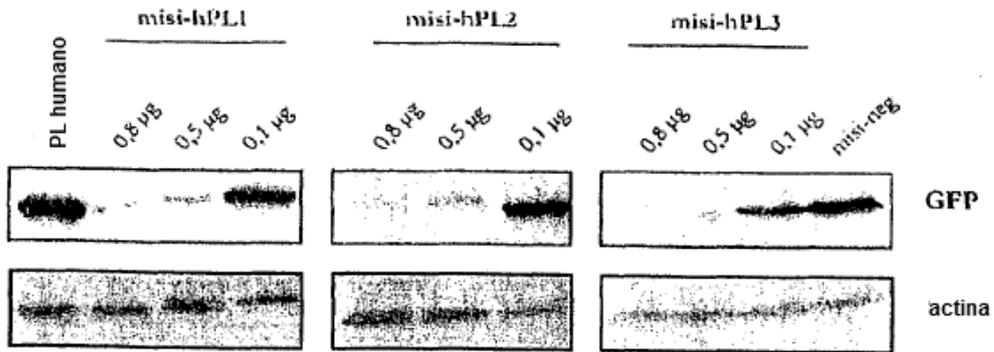


Fig. 3



ARNhp en entorno de miARN	Desactivación génica
misi-hPL1	90 %
misi-hPL2	96 %
misi-hPL3	94 %

Fig. 4

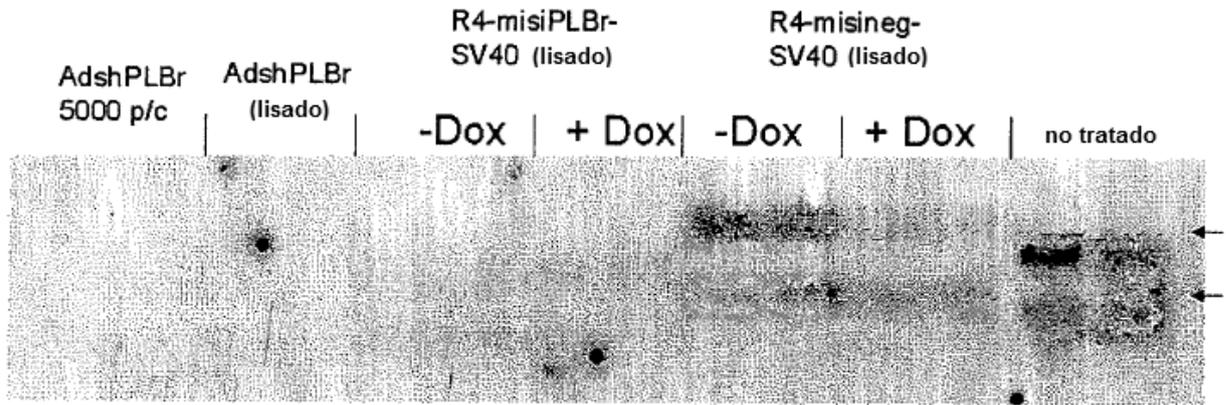


Fig. 5

