

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 659**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**C12N 15/861** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2011 PCT/US2011/032551**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11130552**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2011 E 11769611 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017 EP 2558113**

54 Título: **Composiciones terapéuticas de SERCA2 y métodos de uso**

30 Prioridad:

**15.04.2010 US 324670 P**

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

**17.07.2017**

73 Titular/es:

**ICAHN SCHOOL OF MEDICINE MOUNT SINAI  
(100.0%)  
One Gustave L. Levy Place  
New York, NY 10029, US**

72 Inventor/es:

**HAJJAR, ROGER J.;  
KAWASE, YOSHIKI;  
LADAGE, DENNIS y  
ZSEBO, KRISZTINA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 624 659 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

Composiciones terapéuticas de SERCA2 y métodos de uso

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención por lo general se refiere al tratamiento de enfermedades pulmonares, y de forma más específica, al tratamiento de hipertensión pulmonar en un sujeto mediante el suministro de una proteína de  $\text{Ca}^{++}$  ATPasa del retículo sarcoplasmático que codifica polinucleótido (SERCA2a) en un vector de expresión AAV.

Información de antecedentes

15 La hipertensión pulmonar (PH o PHT) es un aumento de la presión sanguínea en la arteria pulmonar, vena pulmonar, o capilares pulmonares, conocidos como vasculatura pulmonar, que conducen a dificultad para respirar, mareos, desmayos y otros síntomas, todos los cuales se agravan con el esfuerzo. La hipertensión pulmonar puede ser una enfermedad grave con una marcada disminución de la tolerancia al ejercicio e insuficiencia cardiaca.

20 Independientemente de cual sea la causa inicial, hipertensión arterial pulmonar implica la vasoconstricción o endurecimiento de los vasos sanguíneos conectados a los pulmones y dentro de los mismos. Esto hace que sea más difícil que el corazón bombee sangre a través de los pulmones, así como es más difícil hacer que el agua fluya a través de una tubería estrecha en contraposición a una ancha. Con el tiempo, los vasos sanguíneos afectados se vuelven más rígidos y gruesos, en un proceso conocido como fibrosis. Esto aumenta aún más la presión arterial  
25 dentro de los pulmones y perjudica su flujo sanguíneo. Además, el aumento de la carga de trabajo del corazón provoca engrosamiento y agrandamiento del ventrículo derecho, haciendo que el corazón sea menos capaz de bombear sangre a través de los pulmones, causando insuficiencia cardiaca de la parte derecha. A medida que el flujo sanguíneo a través de los pulmones disminuye, el lado izquierdo del corazón recibe menos sangre. Esta sangre  
30 también puede llevar menos oxígeno de lo normal. Por lo tanto, se hace más y más difícil que la parte izquierda del corazón bombee para suministrar el oxígeno suficiente al resto del cuerpo, especialmente durante la actividad física.

La hipertensión venosa pulmonar no implica una obstrucción para el flujo sanguíneo en los pulmones. En su lugar, la parte izquierda del corazón no bombea la sangre de manera eficaz, lo que conduce a la acumulación de sangre en los pulmones. Esto causa edema pulmonar y derrames pleurales.

35 En la hipertensión pulmonar hipóxica, se cree que los niveles bajos de oxígeno causan vasoconstricción o endurecimiento de las arterias pulmonares. Esto conduce a una fisiopatología similar a la de la hipertensión arterial pulmonar.

40 En la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica, los vasos sanguíneos se bloquean o se estrechan con coágulos sanguíneos. De nuevo, esto conduce a una fisiopatología similar a la de la hipertensión arterial pulmonar.

Hasta la fecha, no existe cura conocida para la hipertensión pulmonar. Aunque la terapia con prostaciclina intravenosa (un régimen de tratamiento actual para la hipertensión pulmonar) prolonga la supervivencia en pacientes con PAH, el uso de esta opción de tratamiento está limitado por la corta semivida del fármaco, requisito para un sistema de infusión continua, y complicaciones relacionadas con el catéter. Como tal, los regímenes de tratamiento actuales están destinados a controlar los síntomas asociados con la enfermedad. Cuando la hipertensión pulmonar conduce a otra afección, entonces el tratamiento se dirige por lo general a esa enfermedad subyacente. Por consiguiente, durante mucho tiempo se ha deseado la aparición de una nueva terapia que permita la producción  
50 continua de material terapéutico.

Sumario de la invención

55 La presente invención se basa en el descubrimiento trascendental de que la sobreexpresión de calcio<sup>++</sup> ATPasa (SERCA) del retículo sarcoplasmático (SR) previene la remodelación de las células del músculo liso de los vasos sanguíneos y aumenta la relajación y producción de eNOS, que es un vaso dilatado bien conocido. Como tal, la sobreexpresión de SERCA2a en la arteria pulmonar se usa para tratar la hipertensión pulmonar.

60 En un aspecto, la invención proporciona un vector de expresión vírico adeno-asociado (AAV) para su uso en el tratamiento de hipertensión pulmonar, que comprende un transgén de calcio<sup>++</sup> ATPasa (SERCA) del retículo sarcoplasmático (SR), en el que el transgén es la isoforma 2a de SERCA (SERCA2a) y modula al transporte de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , y en el que la expresión del transgén aumenta la función de la célula hospedadora en un sujeto. El tratamiento de hipertensión pulmonar incluye, pero no se limita a, disminución de la presión sanguínea en la arteria pulmonar y/o la vena pulmonar. Las células hospedadoras pueden estar asociadas con la función pulmonar, tales como células musculares de la arteria pulmonar, células musculares de la vena pulmonar, células musculares de capilar pulmonar, arteriolas pulmonares, alvéolos y células de músculo liso vascular. El vector AAV puede tener el  
65

serotipo 1 (rAAV1), serotipo 2 (AAV2) o serotipo 8 (rAAV8). El tratamiento puede disminuir la presión sanguínea en la arteria pulmonar o la vena pulmonar, puede dar como resultado una presión sistólica inferior y una presión diastólica ventricular inferior, puede mejorar la remodelación vascular pulmonar, puede disminuir la proliferación de células del músculo liso vascular, o puede aumentar la producción de eNOS a partir de células endoteliales.

5 El sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano.

El vector se puede proporcionar con un método seleccionado entre el grupo que consiste en pulverización intranasal, inhalación, y administración por aerosol. El vector se puede suministrar en forma de una micropartícula.

10 En otro aspecto, la invención proporciona un virión de virus adeno-asociado (AAV) recombinante para su uso en el tratamiento de hipertensión pulmonar, en el que (a) el virión comprende un vector AAV que comprende un transgén unido de forma operativa con elementos de control que dirigen la expresión del transgén en una célula hospedadora, (b) la expresión del transgén mejora la función pulmonar, y (c) el transgén es la isoforma 2a (SERCA2a) de calcio<sup>++</sup> ATPasa (SERCA) del retículo sarcoplasmático (SR).

15 En otro aspecto más, la invención proporciona un virión de AAV recombinante (rAAV) para su uso en el tratamiento de hipertensión pulmonar, comprendiendo el rAAV un polinucleótido que codifica una proteína, en el que (a) el polinucleótido está unido de forma operativa a un elemento de control capaz de dirigir la expresión de la proteína, (b) el virión rAAV se administra directamente en una célula muscular pulmonar de un sujeto mamífero, (c) la proteína es la isoforma 2a (SERCA2a) de calcio<sup>++</sup> ATPasa (SERCA) del retículo sarcoplasmático (SR) y (d) la proteína se expresa a un nivel terapéuticamente eficaz en la célula muscular.

20 El sujeto puede ser un ser humano.

25 El virión de AAV recombinante se puede suministrar con un método seleccionado entre el grupo que consiste en pulverización intranasal, inhalación, y administración por aerosol. El virión de AAV recombinante se puede suministrar en forma de una micropartícula.

30 Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A-1D son diagramas gráficos que muestran presiones cardíacas y función en ratas con hipertensión pulmonar después de tratamiento con AAV1 intratraqueal. SERCA2a.

35 Descripción detallada de la invención

40 Antes de describir la presente invención, se debe entender que la presente invención no se limita a composiciones, métodos y condiciones experimentales descritos en particular, ya que tales composiciones, métodos y condiciones pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en el presente documento es solamente para fines de descripción de realizaciones en particular, y no pretende ser limitante, ya que el alcance to de la presente invención se limitará solamente en las reivindicaciones adjuntas.

45 Como se usa en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, las referencias a, "el método", incluyen uno o más métodos, y/o etapas del tipo que se describe en el presente documento que serán evidentes para las personas con experiencia en la materia después de la lectura de la presente divulgación, etc.

50 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende una persona con una experiencia habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque en el presente documento se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los que se describen en el presente documento en la práctica o ensayo de la invención, los métodos y materiales preferentes se describen a continuación.

55 La práctica de la presente invención usará, a menos que se indique específicamente lo contrario, métodos de virología, inmunología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante convencionales dentro de la experiencia en la materia, muchos de los cuales se describen a continuación con fines de ilustración. Las técnicas de este tipo se describen completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2<sup>a</sup> Edición, 1989); Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I y II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames y S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames y S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984).

65 La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad potencialmente mortal, que actualmente no presenta tratamientos establecidos satisfactorios. La transferencia genética usando virus adeno-asociado (AAV) se conoce bien por su seguridad y capacidad de expresar genes exógenos durante periodos prolongados. Se mostró que la

sobreexpresión de SERCA2a previene el remodelamiento de las células del músculo liso vascular (VSMC), disminuye la proliferación de VSMC y aumenta la relajación y producción de eNOS a partir de células endoteliales, que es un vasodilatador bien conocido.

5 Por lo tanto, los métodos proporcionados en el presente documento, utilizan un vector vírico para suministrar el gen de SERCA2 o sus isoformas directamente a los pulmones y/o a células musculares asociadas con la función pulmonar. Un aspecto de la presente invención contempla la transferencia de un polinucleótido terapéutico SERCA2a en una célula. Dicha transferencia emplea un vector de virus adeno-asociado (AAV).

10 Los polinucleótidos SERCA2a se incorporan en un vector vírico para mediar la transferencia a una célula. Las construcciones de expresión adicionales que codifican otros agentes terapéuticos como se describe en el presente documento también se pueden transferir a través de transducción vírica usando partículas víricas infecciosas, por ejemplo, mediante transformación con un virus adeno-asociado (AAV) de la presente invención. Como alternativa, para tales otros agentes terapéuticos se puede usar un retrovirus, un virus del papiloma bovino, un vector de adenovirus, un vector lentivírico, un virus vaccinia, un virus polio, o un virus infeccioso. De forma análoga, para tales otros agentes terapéuticos se pueden usar métodos no víricos que incluyen, pero no se limitan a, administración directa de ADN tal como por perfusión, transfección de ADN desnudo, transfección mediada por liposomas, encapsulación y endocitosis mediada por receptores. Estas técnicas son bien conocidas por los expertos en la técnica y sus particularidades no se encuentran en el punto crucial de la presente invención y por lo tanto no es necesario detallar las de forma exhaustiva en el presente documento. Por ejemplo, un vector vírico se usa para la transducción de células pulmonares para suministrar un polinucleótido terapéuticamente significativo a una célula. El virus puede tener acceso al interior de la célula mediante un medio específico tal como endocitosis mediada por receptor, o mediante un medio no específico tal como pinocitosis.

25 A continuación se describirá un número de vectores a modo de ejemplo. Se observará que la presente invención utiliza vectores de expresión vírica adeno-asociados o viriones de AAV recombinante.

*Virus adeno-asociado (AAV)*

30 Se ha mostrado que el virus adeno-asociado (AAV) es una promesa para el suministro de genes para terapia genética en ensayos clínicos en seres humanos. Como el único sistema de vectores víricos basado en un virus no patógeno y de replicación defectuosa, los viriones de AAV recombinantes se han usado de forma satisfactoria para establecer una transferencia genética eficaz y sostenida tanto de células proliferantes como diferenciadas terminalmente en una diversidad de tejidos.

35 El genoma de AAV es una molécula lineal de ADN de cadena sencilla que contiene aproximadamente 4681 nucleótidos. El genoma de AAV por lo general comprende un genoma interno no repetitivo flanqueado en cada extremo por repeticiones terminales invertidas (ITR). Las ITR tienen una longitud de aproximadamente 145 pares de bases (pb). Las ITR tienen múltiples funciones, incluyendo como orígenes de la replicación del ADN, y como señales de empaquetamiento para el genoma vírico. La porción interna no repetida del genoma incluye dos grandes marcos de lectura abiertos, conocidos como genes de replicación (rep) y cápside (cap) de AAV. Los genes rep y cap codifican proteínas víricas que permiten que el virus se replique y empaquete en un virión. En particular, una familia de al menos cuatro proteínas víricas se expresa a partir de la región rep de AAV, Rep 78, Rep 68, Rep 52, y Rep 40, denominadas de acuerdo con su peso molecular aparente. La región cap de AAV codifica al menos tres proteínas, VP1, VP2 y VP3.

40 El AAV se ha modificado por ingeniería para proporcionar genes de interés mediante delección de la parte no repetitiva interna del genoma de AAV (es decir, los genes rep y cap) y para insertar un gen heterólogo entre las ITR. El gen heterólogo por lo general se une funcional u operativamente a un promotor heterólogo (constitutivo, específico de célula, o inducible) capaz de dirigir la expresión genética en las células diana del paciente en condiciones apropiadas. También se pueden incluir señales de terminación, tales como sitios de poliadenilación.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "vector AAV" se refiere a un vector obtenido a partir de un serotipo de virus adeno-asociado, que incluye, pero no se limita a, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, y formas mutadas de los mismos. Los vectores de AAV pueden tener uno o más de los genes de tipo silvestre de AAV con delección total o parcial, preferentemente los genes rep y/o cap, pero conservan secuencias de ITR de flanco funcionales. A pesar del alto grado de homología, los diferentes serotipos tienen tropismos para diferentes tejidos. El receptor de AAV1 es desconocido; sin embargo, se sabe que AAV1 transduce músculo esquelético y liso de manera más eficaz que AAV2. Sin quedar ligado por la teoría, ya que la mayoría de los estudios se han realizado con vectores pseudotipados en los que el ADN vector flanqueado con la ITR de AAV2 se empaqueta en cápsides de serotipos alternativos, es evidente que las diferencias biológicas están relacionadas con la cápside en lugar de con los genomas. La evidencia reciente indica que los casetes de expresión de ADN empaquetados en cápsides de AAV1 son al menos 1 log<sub>10</sub> más eficientes en la transducción de cardiomiocitos que los empaquetados en cápsides de AAV2.

65

Las secuencias de ITR funcional son necesarias para el rescate, replicación y empaquetamiento del virión de AAV. Por lo tanto, el vector AAV se define en el presente documento para incluir al menos aquellas secuencias requeridas en cis para replicación y empaquetamiento (por ejemplo, las ITR funcionales) del virus. No es necesario que las ITR sean secuencias de nucleótidos de tipo silvestre, y se puedan alterar, por ejemplo, mediante la inserción, delección o

5 substitución de nucleótidos, siempre y cuando las secuencias proporcionen rescate, replicación y empaquetamiento funcionales.

Los vectores AAV deben tener una copia de las secuencias de repetición terminales invertidas de AAV (ITR) en cada extremo del genoma para su replicación, empaquetamiento en partículas de AAV y su integración de forma eficaz en cromosomas celulares. Sin embargo, el ácido nucleico estimulado por ITR puede ser cualquier secuencia deseada. En una realización, el ácido nucleico codifica un polipéptido SERCA2 o su isoforma (por ejemplo, SERCA2a), que tiene una función deseada en la célula en la que se expresa el vector. Por ejemplo, el polipéptido SERCA2 aumenta el control del almacenamiento y la regulación de  $Ca^{++}$  en la célula, disminuyendo de ese modo la presión arterial en las arterias de los pulmones.

10

15

La ITR consiste en los nucleótidos 1 a 145 en el extremo izquierdo del genoma de ADN de AAV y los nucleótidos correspondientes 4681 a 4536 (es decir, la misma secuencia) en el extremo derecho del genoma de ADN de AAV. Por lo tanto, los vectores AAV deben tener un total de al menos 300 nucleótidos de la secuencia terminal. Por lo tanto, para el empaquetamiento de grandes regiones codificantes en partículas de vector AAV, es importante desarrollar las secuencias reguladoras más pequeñas posibles, tales como promotores de transcripción y señal de adición de poliA. En este sistema, el vector vírico adeno-asociado que comprende las secuencias de repetición terminal invertida (ITR) del virus adeno-asociado y un ácido nucleico que codifica SERCA (por ejemplo, SERCA2), sus isoformas, fragmentos y/o variantes, en el que las secuencias de repetición terminales invertidas estimulan la expresión del ácido nucleico en ausencia de otro promotor.

20

25

Por consiguiente, como se usa en el presente documento, AAV se refiere a todos a los serotipos de AAV (*es decir*, 1-9) y formas mutadas de los mismos. Por lo tanto, en la técnica es habitual usar las secuencias de ITR de otros serotipos de AAV, ya que se espera que las ITR de todos los serotipos de AAV tengan estructuras y funciones similares con respecto a mecanismos de replicación, integración, escisión y transcripción.

30

El AAV también es un virus dependiente de auxiliar. Es decir, se requiere coinfección con un virus auxiliar (por ejemplo, adenovirus, virus del herpes o vaccinia), con el fin de formar viriones de AAV. En ausencia de coinfección con un virus auxiliar, el AAV establece un estado latente en el que el genoma vírico se inserta en una célula hospedadora del cromosoma, pero no se producen viriones infecciosos. La infección posterior con un virus auxiliar "rescata" el genoma integrado, permitiendo que replique y empaquete su genoma en un virión de AAV infeccioso. Aunque el AAV puede infectar células de diferentes especies, el virus auxiliar debe ser de la misma especie que la célula hospedadora. Por lo tanto, por ejemplo, el AAV humano se replicará en células caninas coinfectadas con un adenovirus canino.

35

La expresión "funciones auxiliares de AAV" se refieren a secuencias codificantes obtenidas a partir de AAV que se pueden expresar para proporcionar productos genéticos de AAV que, a su vez, funcionan en trans para la replicación productiva de AAV. Por lo tanto, las funciones auxiliares de AAV incluyen ambos de los marcos de lectura abiertos (ORF) de AAV principales, rep y cap. Se ha mostrado que los productos de expresión de Rep tienen poseen muchas funciones, incluyendo, entre otras: reconocimiento, unión y corte del origen de AAV de replicación del ADN; actividad de ADN helicasa; y modulación de la transcripción de promotores de AAV (u otros heterólogos). Los productos de expresión de Cap proporcionan las funciones de empaquetamiento necesarias. Las funciones auxiliares de AAV se usan en el presente documento para complementar funciones de AAV en trans que faltan a partir de vectores AAV.

40

45

Por consiguiente, la expresión "construcción auxiliar de AAV" se refiere por lo general a una molécula de ácido nucleico que incluye secuencias de nucleótidos que proporcionan funciones de AAV con delección a partir de un vector AAV que se va a usar para producir un vector de transducción para proporcionar una secuencia de nucleótidos de interés. Las construcciones auxiliares de AAV se usan comúnmente para proporcionar la expresión transitoria de genes rep y/o cap de AAV para complementar las funciones ausentes de AAV que son necesarias para la replicación del AAV lítico; sin embargo, las construcciones auxiliares carecen de las ITR de AAV y no pueden replicarse ni empaquetarse por sí mismas. Las construcciones auxiliares de AAV pueden estar en forma de un plásmido, fago, transposón, cósmido, virus o virión. Se han descrito varias construcciones auxiliares de AAV y vectores que codifican productos de expresión de Rep y/o Cap.

50

55

Por lo general, el virus AAV recombinante (rAAV) se produce mediante cotransfección de un plásmido que contiene el gen de interés flanqueado por las dos repeticiones terminales de AAV y/o un plásmido de expresión que contiene las secuencias codifica antes de AAV de tipo silvestre sin las repeticiones terminales, por ejemplo pIM45. Las células también se infectan y/o transfectan con adenovirus y/o plásmidos que portan los genes de adenovirus requeridos para la función auxiliar de AAV. Las reservas de virus de rAAV preparadas de esta manera se contaminan con adenovirus que deben estar físicamente separados de las partículas de rAAV (por ejemplo, mediante centrifugación de densidad de cloruro de cesio o cromatografía en columna). Como alternativa, se podrían usar vectores de

60

65

adenovirus que contienen las regiones codificantes de AAV y/o líneas celulares que contienen las regiones codificantes de AAV y/o algunos o todos los genes auxiliares de adenovirus. También se pueden usar líneas celulares que portan el ADN de rAAV como un provirus integrado.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "funciones auxiliares" se refiere a funciones víricas y/o celulares no obtenidas a partir de AAV sobre las que AAV es dependiente para su replicación. Por lo tanto, la expresión incluye proteínas y los ARN que son necesarios en la replicación de AAV, incluyendo los restos implicados en la activación de la transcripción genética de AAV, el corte y empalme específico de ARNm de AAV específico de etapa, replicación de ADN de AAV, síntesis de productos de expresión de Cap y ensamblaje de cápside de AAV. Las  
10 funciones auxiliares basadas en virus se pueden obtener a partir de cualquiera de los virus auxiliares conocidos tales como adenovirus, virus del herpes (distintos del virus del herpes simple de tipo 1) y virus vaccinia.

Por consiguiente, "vector de función auxiliar" se refiere al a una molécula de ácido nucleico que incluye secuencias de nucleótidos que proporcionan funciones auxiliares. Un vector de función auxiliar se puede transfectar en una  
15 célula hospedadora adecuada, en la que el vector a continuación es capaz de apoyar la producción de virión de AAV en la célula hospedadora. En la expresión quedan excluidas de forma expresa las partículas víricas infecciosas tal como existen en la naturaleza, tales como partículas de adenovirus, virus del herpes o virus vaccinia. Por lo tanto, los vectores de función auxiliar también pueden estar en forma de un plásmido, fago, transposón o cósmido.

20 En particular, se ha demostrado que el complemento total de genes de adenovirus no es necesario para las funciones auxiliares accesorias. En particular, se ha mostrado que los mutantes de adenovirus incapaces de replicar el ADN y la síntesis genética tardía permiten la replicación de AAV. De forma análoga, se ha mostrado que los mutantes dentro de las regiones E2B y E3 apoyan la replicación de AAV, lo que indica que las regiones E2B y E3 probablemente no están implicadas en el suministro de funciones auxiliares. Sin embargo, los adenovirus defectuosos en la región E1, o que tienen una región E4 con delección, no pueden apoyar la replicación de AAV. Por  
25 lo tanto, es probable que las regiones E1A y E4 sean necesarias para la replicación de AAV, ya sea directa o indirectamente. Otros mutantes de Ad caracterizados incluyen: E1B; E2A; E2B; E3; y E4. Aunque algunos estudios de las funciones auxiliares proporcionadas por adenovirus que tienen mutaciones en la región codificante de E1B han producido resultados contradictorios, recientemente se ha informado que E1B55k es necesario para la  
30 producción de virión de AAV, mientras que E1B19k no lo es.

Los vectores de función auxiliar a modo de ejemplo incluyen una región codificante de ARN de VA de adenovirus, una región codificante de ORF6 de E4 de adenovirus, una región codificante de 72 kD de E2A de adenovirus, una  
35 región codificante de E1A de adenovirus, y una región que carece de E1B de adenovirus que carece de una región codificante de E1B55k intacta.

Por "capaz de apoyar la producción de virión de rAAV eficaz" se hace referencia la capacidad de un vector o sistema de función accesorio para facilitar funciones accesorias que son suficientes para complementar la producción de virión de rAAV en una célula hospedadora particular a un nivel sustancialmente equivalente o mayor que la que se  
40 podría obtener después de la infección de la célula hospedadora con un virus auxiliar de adenovirus. Por lo tanto, la capacidad de un vector o sistema de función auxiliar para soportar la producción eficaz de virión de rAAV se puede determinar comparando los títulos de virión de rAAV obtenidos usando el vector o sistema auxiliar con títulos obtenidos usando infección con un adenovirus infeccioso. Más particularmente, un vector o sistema de función auxiliar soporta una producción de virión rAAV eficaz sustancialmente equivalente a, o superior a, la obtenida  
45 usando un adenovirus infeccioso cuando la cantidad de viriones obtenida a partir de un número equivalente de células hospedadoras no es más que aproximadamente 200 veces inferior a la cantidad obtenida usando la infección por adenovirus, más preferentemente no superior a aproximadamente 100 veces menos, y más preferentemente igual a, o superior a, la cantidad obtenida usando la infección por adenovirus.

50 Por lo tanto, por "virión de AAV" se hace referencia a una partícula de virus completa, tal como una partícula de virus de AAV de tipo silvestre (wt) (que comprende un genoma de ácido nucleico de AAV lineal, de cadena sencilla asociado con un revestimiento de proteína de cápside de AAV). En este sentido, se pueden empaquetar moléculas de ácido nucleico de AAV de cadena sencilla de cualquier sentido complementario, por ejemplo, cadenas "sentido" o "antisentido", en uno cualquiera de virión de AAV y ambas hebras son igualmente infecciosas.

55 De forma análoga, un "virión de AAV recombinante", o "virión de rAAV" se define en el presente documento, un virus infeccioso de replicación defectuosa que incluye una envoltura proteica de AAV que encapsula una secuencia de nucleótidos heteróloga de interés que está flanqueada en ambos por las ITR de AAV. Se produce un virión de rAAV en una célula hospedadora adecuada que ha tenido un vector AAV, funciones auxiliares de AAV, y funciones auxiliares introducidas en el mismo. De esta manera, la célula hospedadora se hace capaz de codificar polipéptidos de AAV que son necesarios para el empaquetamiento del vector AAV (que contiene una secuencia de nucleótidos recombinante de interés) en partículas de virión recombinantes infecciosas para posterior administración genética.

60 El sistema de AAV útil en la invención, también puede incluir una secuencia que codifica un marcador seleccionable. La expresión "marcador seleccionable" o "producto genético seleccionable", como se usa en el presente documento, se refiere al uso de un gen que puede incluir, pero no se limita a: el gen de fosfotransferasa en la posición 3' de

aminoglucósido bacteriano (también denominado gen neo) que confiere resistencia al fármaco G418 en células de mamífero; gen bacteriano de higromicina G fosfotransferasa (hyg) que confiere resistencia al antibiótico higromicina; y el gen bacteriano de xantina-guanina fosforribosil transferasa (también denominado gen gpt) que confiere la capacidad de crecer en presencia de ácido micofenólico. Además, el sistema de AAV puede incluir secuencias que codifican un marcador visual detectable, por ejemplo, proteína fluorescente de color verde (GFP) o cualquier otro marcador detectable convencional en la técnica y pueden ser identificados y utilizados por un experto en la materia sin experimentación indebida.

Los expertos en la materia han eludido algunas de las limitaciones de los vectores basados en adenovirus usando virus "híbridos" de adenovirus, que incorporan características deseables de adenovirus así como de otros tipos de virus como un medio para generar vectores únicos con propiedades altamente especializadas. Por ejemplo, se generaron quimeras de virus de vector entre adenovirus y virus adenoasociado (AAV). Estos aspectos de la invención no se desvían del alcance de la invención que se describe en el presente documento.

Otro método para la administración del polinucleótido para terapia genética implica el uso de un vector de expresión de adenovirus. Como se usa en el presente documento, la expresión "vector de expresión de adenovirus" pretende incluir aquellas construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes (a) para soportar el empaquetamiento de la construcción y/o (b) para expresar por último un tejido y/o construcción específica de célula que se ha clonado en el mismo.

El vector de expresión puede comprender una forma genéticamente modificada de adenovirus. El conocimiento de la organización genética del adenovirus, un virus de ADN de 36 kb, lineal, de doble cadena, permite la sustitución de grandes fragmentos de ADN adenovírico con secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus y Horwitz, Seminar in Virology, 1992; 3: 237-252). A diferencia con el retrovirus, la infección adenovírica de células hospedadoras no da como resultado una integración cromosómica porque el ADN adenovírico se puede replicar de una manera episómica sin genotoxicidad potencial. Además, los adenovirus son estructuralmente estables, y no se ha detectado ningún recolocación del genoma después de haber detectado una amplia amplificación.

El crecimiento y manipulación de adenovirus son conocidos por los expertos en la materia, y presenta una amplia gama de hospedadores *in vitro* e *in vivo*. Este grupo de virus se puede obtener en altos títulos, por ejemplo, de, 10<sup>9</sup> a 10<sup>11</sup> unidades formadoras de placa por ml, y son altamente infecciosos. El ciclo de vida del adenovirus no requiere integración en el genoma de la célula hospedadora. Los genes extraños suministrados por los vectores de adenovirus son episómicos y, por lo tanto, tienen baja genotoxicidad para las células hospedadoras. No se han informado efectos secundarios en estudios de vacunación con adenovirus de tipo silvestre, lo que demuestra su seguridad y/o potencial terapéutico como vectores de transferencia genética *in vivo*.

Los vectores de adenovirus se han usado en expresión de genes eucarióticos y en el desarrollo de vacunas. Recientemente, algunos estudios en animales sugirieron que se podría usar adenovirus recombinante para terapia genética (véase, por ejemplo, Stratford-Perricaudet *et al.*, Hum. Gene. Ther., 1991; 1: 242-256; Rich *et al.*, 1993). Los estudios en administración de adenovirus recombinante a diferentes tejidos incluyen inyección muscular, inyecciones intravenosas periféricas e inoculación estereotáctica en el cerebro. El adenovirus recombinante y el virus adeno-asociado pueden tanto infectar como transducir células primarias humanas que no están en división.

Aunque el uso de vectores de adenovirus se contempla, tal uso en ensayos de terapia genética en la actualidad está limitado por la expresión transgénica de corta duración. (Vassalli G, *et al.*, Int. J. Cardiol., 2003; 90 (2-3): 229-38). Esto se debe a la inmunidad celular contra antígenos adenovíricos. Los vectores adenovíricos "cobardes" mejorados tienen una reducción de la inmunogenicidad, pero siguen siendo ineficaces si se necesita una expresión máxima del transgén durante más de seis meses o se desean efectos terapéuticos (Gilbert R, *et al.*, Hum. Mol. Genet., 2003; 12 (11): 1287-99). Los vectores AAV han demostrado una expresión a largo plazo (> 1 año) y son el vector precedente para efectos terapéuticos en los que se necesita una expresión a largo plazo (Daly TM, *et al.*, Gene Ther., 2001; 8 (17): 1291-8).

#### Vectores Retrovíricos

Los retrovirus se pueden elegir como vectores de administración de genes debido a su capacidad para integrar sus genes en el genoma hospedador, transferir una gran cantidad de material genético extraño, infectar un amplio espectro de especies y tipos celulares y para su empaquetamiento en líneas celulares especiales.

El genoma retrovírico contiene tres genes, gag, pol y env que codifican las proteínas de la cápside, enzima polimerasa y componentes de la envoltura, respectivamente. Una secuencia encontrada cadena arriba del gen gag contiene una señal para el empaquetamiento del genoma en viriones. Dos secuencias de repetición terminal largas (LTR) están presentes en los extremos en las posiciones 5' y 3' del genoma vírico. Estas contienen secuencias promotoras y potenciadoras fuertes y también son necesarias para la integración en el genoma de la célula hospedadora.

Para construir un vector retrovítico, un ácido nucleico que codifica un gen de interés se inserta en el genoma vírico en lugar de ciertas secuencias víricas para producir un virus que tiene una replicación defectuosa. Con el fin de producir viriones, se construye una línea celular de empaquetamiento que contiene los genes gag, pol, y/o env pero sin los componentes de de LTR y/o empaquetamiento. Cuando se introduce un plásmido recombinante que contiene un ADNc, junto con la LTR retrovítica y las secuencias de empaquetamiento en esta línea celular (mediante precipitación con fosfato cálcico por ejemplo), la secuencia de empaquetamiento permite que la transcripción de ARN del plásmido recombinante se empaquete en partículas víricas, que a continuación se secretan en el medio de cultivo. A continuación, el medio que contiene los retrovirus recombinantes se recoge, se concentra opcionalmente y se usa para transferencia genética. Los vectores retrovíticos son capaces de infectar una amplia diversidad de tipos celulares. Sin embargo, la integración y la expresión estable requieren la división de las células hospedadoras.

#### *Virus del Herpes*

Dado que el virus del herpes simple (VHS) es neurotrópico, se ha generado un interés considerable en el tratamiento de los trastornos del sistema nervioso. Además, la capacidad del VHS para establecer infecciones latentes en células neuronales que no se dividen sin integrarse en el cromosoma de la célula hospedadora o alterando de otro modo el metabolismo de la célula hospedadora, con la existencia de un promotor que es activo durante la latencia hace que el VHS sea un vector atractivo. Y aunque se ha centrado mucha atención en las aplicaciones neurotrópicas del VHS, este vector también se puede aprovechar para otros tejidos dada su amplia gama de hospedadores.

Otro factor que hace que el VHS sea un vector atractivo es el tamaño y organización del genoma. Dado 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 de control vírico con un rendimiento variable (temporal, resistencia, etc.) hace posible controlar la expresión en mayor medida que en otros sistemas. También es una ventaja que el virus tenga relativamente pocos mensajes de corte y empalme, lo que facilita aún más las manipulaciones genéticas.

El VHS también es relativamente fácil de manipular y puede crecer hasta títulos elevados. Por lo tanto, la administración es menos que un problema, tanto en términos de volúmenes necesarios para alcanzar una multiplicidad de infección (MOI) suficiente y con una necesidad menor de repetir la dosificación. Para una revisión del VHS como vector para terapia genética, véase Glorioso *et al.*, Annu. Rev. Microbiol., 1995; 49: 675-710. Se han desarrollado variantes avirulentas del VHS y están disponibles fácilmente para su uso en contextos de terapia genética (documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.672.344).

#### *Vectores Lentivíricos*

Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovíticos comunes gag, pol y env, contienen otros genes con función reguladora o estructural. La mayor complejidad permite que el virus modifique su ciclo de vida, como ocurre en el curso de la infección latente. Algunos ejemplos de lentivirus incluyen los Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH 1, VIH 2) y el Virus de la Inmunodeficiencia del Simio (SIV). Se han generado vectores lentivíricos por atenuación múltiple de los genes de virulencia del VIH, por ejemplo, los genes env, vif, vpr, vpu y nef sufren delección haciendo que el vector sea biológicamente seguro.

Los vectores lentivíricos se conocen en la técnica, véanse, por ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 6.013.516 y 5.994.136. En general, los vectores están basados en plásmidos o basados en virus, y se configuran para portar las secuencias esenciales para incorporar ácido nucleico extraño, para selección y para transferencia del ácido nucleico en una célula hospedadora. Los genes gag, pol y env de los vectores de interés también se conocen en la técnica. Por lo tanto, los genes relevantes se clonan en el vector seleccionado y a continuación se usan para transformar la célula diana de interés.

El lentivirus recombinante capaz de infectar una célula que no está en división en el que una célula hospedadora adecuada se transfecta con dos o más vectores que portan las funciones de empaquetamiento, es decir, gag, pol y env, así como rev y tat se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.994.136. Este describe un primer vector que puede proporcionar un ácido nucleico que codifica un gag vírico y un gen pol y otro vector que puede proporcionar un ácido nucleico que codifica un env vírico para producir una célula de empaquetamiento. La introducción de un vector que proporciona un gen heterólogo en esa célula de empaquetamiento proporciona una célula productora que libera partículas víricas infecciosas que portan el gen extraño de interés. El env es preferentemente una proteína de envoltura anfotrópica que permite la transducción de células de especies humanas y de otras especies.

#### *Vectores de Virus Vaccinia*

Los vectores de virus vaccinia se han usado ampliamente debido a la facilidad de su construcción, niveles relativamente altos de expresión obtenidos, amplia gama de osciladores y gran capacidad para portar el ADN. Vaccinia contiene un gen de ADN de doble hélice de aproximadamente 186 kb que presenta una preferencia notable

de "A-T". El extremo terminal invertido reproduce aproximadamente el flanco de 10,5 kb del genoma. Parece que la mayoría de los genes esenciales forman un mapa dentro de la región central, que está más altamente conservada entre los virus de la viruela. Un cálculo de los marcos de lectura abiertos en el virus vaccinia da un número de 150 a 200. Aunque ambas cadenas son codificantes, la amplia superposición de marcos de lectura no es común.

Al menos 25 kb se pueden insertar en el genoma del virus vaccinia. Los vectores de vaccinia prototípicos contienen transgenes insertados en el gen de la timidina quinasa vírica mediante recombinación homóloga. Los vectores se seleccionan sobre la base de un fenotipo 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, con los transgenes acumulándose en un 10 % o más de la proteína de la célula infectada en 24 h.

#### *Vectores de Virus de Polioma*

Las cápsidas vacías de papovavirus, tales como el virus del polioma de ratón, han recibido atención como posibles vectores para transferencia genética. El uso de polioma vacío se describió por primera vez cuando el ADN de polioma y cápsidas vacías purificadas se incubaron en un sistema libre de células. El ADN de la nueva partícula se protegió de la acción de la DNasa pancreática. Las partículas reconstituidas se usaron para transferir un fragmento de ADN de polioma transformante a células FIII de rata. Las cápsidas vacías y las partículas reconstituidas consisten en los tres antígenos de la cápside de polioma, VP1, VP2 y VP3. El documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.046.173, desvela el uso de una pseudocápside formada a partir del antígeno de la cápside principal de papovavirus y excluyendo antígenos menores de la cápside, que incorpora material exógeno para transferencia genética.

#### *Otros Vectores Víricos*

Otros vectores víricos se pueden emplear como construcciones de expresión tales como vectores obtenidos a partir de virus tales como virus sindbis o citomegalovirus. Estos ofrecen características atractivas para diversas células de mamífero (véase, *por ejemplo*, Friedmann, Science, 1989; 244: 1275-1281; Horwich *et al.*, J. Virol., 1990; 64: 642-650).

Con el reconocimiento de los virus defectuosos de la hepatitis B, se obtuvo una nueva visión de la relación estructura-función de diferentes secuencias víricas. Los estudios *in vitro* demostraron que el virus podía conservar la capacidad de empaquetamiento dependiente de auxiliar y transcripción inversa a pesar de la delección de hasta un 80 % de su genoma (Horwich *et al.*, J. Virol. 64: 642-650 (1990)). Esto sugería que grandes porciones del genoma se podrían sustituir con material genético extraño. Chang *et al.*, introdujeron el gen de la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT) en el genoma del virus de la hepatitis R de pato en el lugar de las secuencias codificantes de polimerasa, superficie y/o presuperficie. Se cotransfectó con el virus de tipo silvestre en una línea de células de hepatoma aviar. Se usaron medios de cultivo que contenían títulos altos del virus recombinante para infectar hepatocitos de patito primario. La expresión del gen de CAT estable se detectó durante al menos 24 días después de la transfección (Chang *et al.*, Hepatology 14: 134A (1991)).

#### *Virus Modificados*

Los ácidos nucleicos a suministrar se pueden alojar dentro de un virus infeccioso que se ha modificado por ingeniería para expresar un ligando de unión específico. La partícula del virus se unirá de ese modo de forma específica a los receptores afines de la célula diana y suministrará los contenidos a la célula. Un nuevo enfoque diseñado para permitir el direccionamiento específico de vectores de retrovirus se desarrolló basándose 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 sialoglicoproteína.

Se diseñó otro enfoque para dirigir retrovirus recombinantes en el que se usaron anticuerpos biotinilados contra una proteína de la envoltura retroviral o contra un receptor celular específico. Los anticuerpos se acoplaron a través de los componentes de biotina usando estreptavidina. Usando anticuerpos contra antígenos del complejo de histocompatibilidad principal de clase I y/o de clase II, estos demostraron la infección de una diversidad de células humanas que portaban esos antígenos de superficie con un virus ecotrópico *in vitro*.

#### *Transferencia no vírica*

En el presente documento se desvelan varios métodos no víricos para la transferencia de construcciones de expresión en células de mamífero cultivadas. Los métodos adecuados para la administración de ácidos nucleicos incluyen métodos como se describe en el presente documento o cómo podría conocer una persona con una experiencia habitual. Los métodos de este tipo incluyen, pero no se limitan a, administración directa de plásmido de ADN "desnudo" a través de la vasculatura (documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.867.196); mediante transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991) y transfección mediada por receptor (Wu y Wu, 1987; Wu y Wu, 1988); mediante agitación con fibras de carburo de silicio (Kaeppeler *et al.*, 1990; documentos de Patente de Estados Unidos

N.º 5.302.523 y 5.464.765); uso de lípidos catiónicos; ADN desnudo; o mediante ADN microencapsulado (Solicitud de Patente de Estados Unidos N.º 2005/0037085). Mediante la aplicación de técnicas de este tipo, las células o tejido diana se pueden transformar de forma estable o transitoria.

5 Una vez que la construcción se ha suministrado en la célula, el ácido nucleico que codifica el gen terapéutico se puede colocar y expresar en diferentes sitios. El ácido nucleico que codifica el gen terapéutico se puede integrar de forma estable en el genoma de la célula. Esta integración se puede producir en la posición y orientación similares a través de recombinación homóloga (reemplazo genético) o se puede integrar en una posición aleatoria, no específica (aumento genético). El ácido nucleico se prevé mantener de forma estable en la célula como un segmento  
10 de ADN episómico, separado. Tales segmentos de ácido nucleico o "episomas" codifican secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y la replicación independiente o en sincronización con el ciclo de la célula hospedadora. Cómo se administra la construcción de expresión a una célula y en qué sitio de la célula permanece el ácido nucleico depende del tipo de construcción de expresión empleada.

15 La construcción de expresión puede estar atrapada en un liposoma. Los liposomas son estructuras vesiculares caracterizadas por una membrana de bicapa fosfolipídica y un medio acuoso interno. Los liposomas multilamelares tienen múltiples capas lipídicas separadas por medio acuoso. Se forman de manera espontánea cuando los fosfolípidos se suspenden en un exceso de solución acuosa. Los componentes lipídicos se someten a autorreordenamiento antes de la formación de estructuras cerradas y atrapan agua y solutos disueltos entre las  
20 bicapas lipídicas. La adición de ADN a liposomas catiónicos provoca una transición topológica de liposomas a glóbulos condensados de cristalino líquido ópticamente birrefringentes. Estos complejos de ADN-lípido son vectores no víricos potenciales para uso en terapia genética.

25 La administración de ácido nucleico mediada por liposomas y la expresión de ADN extraño *in vitro* ha sido muy satisfactoria. Usando el gen de  $\beta$ -lactamasa, los investigadores demostraron la viabilidad de la administración mediada por liposomas y la expresión de ADN extraño en células de embrión de pollo cultivadas, HeLa y células de hepatoma. También se ha logrado una transferencia genética de liposomas con éxito en ratas después de inyección intravenosa. También se incluyen diversos enfoques comerciales relacionados con la tecnología de "lipofección".

30 El liposoma puede formar complejo con un virus hemaglutinante (HVJ). Se ha demostrado que esto facilita la fusión con la membrana celular y estimular la entrada de células de ADN encapsulado en liposomas. El liposoma puede formar complejo o se puede usar en conjunto con proteínas cromosómicas nucleares no histonas (HMG-1). El liposoma puede formar complejo o se puede usar en conjunto tanto con HVJ como con HMG-I. Para esto se han usado las construcciones de expresión de este tipo de forma satisfactoria en transferencia y expresión de ácido  
35 nucleico *in vitro* e *in vivo*, por lo tanto se pueden aplicar para la presente invención.

Otros sistemas de administración de vectores que se pueden emplear para suministrar un ácido nucleico que codifica un gen terapéutico en células son vehículos de administración mediados por receptor. Estos aprovechan de la absorción selectiva de macromoléculas por endocitosis mediada por receptor en casi todas las células eucariotas.  
40 Debido a la distribución específica del tipo de célula de diversos receptores, la administración puede ser altamente específica (Wu y Wu, 1993). Cuando se emplean liposomas, se pueden usar otras proteínas que se unen a una proteína de membrana de superficie celular asociada con endocitosis para dirigir y/o para facilitar la absorción, por ejemplo, proteínas de la cápside o fragmentos de la misma para un tipo de célula en particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en el ciclo y proteínas que se dirigen a la localización intracelular y  
45 aumentan la semivida intracelular.

Los vehículos de direccionamiento genético mediados por receptores por lo general están formados por dos componentes: un ligando específico de receptor celular y un agente de unión a ADN. Para transferencia genética mediada por receptores se han usado varios ligandos. Los ligandos más ampliamente caracterizados son asialoorosomucoide (ASOR) y transferencia (Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 87 (9): 3410-14 (1990)). Como vehículo de administración genética se ha usado una neoglicoproteína sintética, que reconoce el mismo receptor que ASOR. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) también se ha usado para administrar genes a células de carcinoma escamoso.

55 En otras realizaciones, el vehículo de administración puede comprender un ligando y un liposoma. Por ejemplo, los investigadores han empleado lactosil-ceramida, un asialgangliósido galactosa-terminal, incorporado en liposomas y ha observado un aumento de la absorción del gen de la insulina por los hepatocitos. Por lo tanto, es factible que un ácido nucleico que codifica un gen terapéutico también se pueda suministrar de forma estable en un tipo de célula tal como células cardíacas, mediante cualquier número de sistemas de receptor-ligando con o sin liposomas.

60 La construcción de expresión puede consistir simplemente en ADN o plásmidos recombinantes desnudos. La transferencia de la construcción se puede realizar mediante cualquiera de los métodos mencionados anteriormente que permeabilizan física o químicamente la membrana celular. Esto se puede aplicar en particular para transferencia *in vitro*, sin embargo, también se puede aplicar para uso *in vivo*. Se prevé que el ADN terapéutico también se pueda transferir de una manera similar *in vivo*. Wolff *et al.*, (documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.867.196)  
65 enseñan que la transferencia genética eficaz en el tejido cardíaco se puede obtener mediante inyección de

soluciones de ADN plasmídico en una vena o arteria del corazón. Wolff también enseña la administración de ARN, ADN no plasmídico y vectores víricos.

Los vectores útiles en la presente invención tienen diferentes eficiencias de transducción. Como resultado, el vector de expresión de AAV transduce más de, igual a, o al menos aproximadamente un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, un 100 % de las células del territorio vascular al que se dirige. Se puede usar más de un vector de expresión de AAV de forma simultánea, en forma secuencial. Esto se puede usar para transferir más de un polinucleótido, y/o diana a más de un tipo de célula. Cuando se usan múltiples vectores o múltiples agentes, se puede obtener más de una transducción/transfección.

En la presente invención se incluyen diversas secuencias de ácidos nucleicos. Como se usa en el presente documento, secuencia de "ácido nucleico" o equivalentes de la misma se refiere a una secuencia de ADN o ARN. La expresión capta secuencias que incluyen cualquiera de los análogos conocidos de base de ADN y ARN tales como, pero no limitados a, 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-fluorouracilo 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metil-guanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiamino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, éster de metilo del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutuosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster de metilo del ácido -uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, y 2,6-diaminopurina.

Otras secuencias de ácidos nucleicos incluyen "secuencias de control", que se denominan de forma colectiva secuencias promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores cadena arriba, orígenes de replicación, sitios internos de entrada de ribosomas (IRES), potenciadores y similares, que de forma colectiva proporcionan la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No es necesario que todas estas secuencias de control estén siempre presentes siempre y cuando la secuencia de codificación seleccionada sea capaz de ser replicada, transcrita y traducida en una célula hospedadora apropiada.

Otra secuencia de ácidos nucleicos es una secuencia "promotora" que se usa en el presente documento en su sentido habitual para hacer referencia a una región del nucleótido que comprende una secuencia reguladora de ADN, en la que la secuencia reguladora se obtiene a partir de un gen que es capaz de unirse a la ARN polimerasa y de iniciar la transcripción de una secuencia codificante cadena abajo (dirección en la posición 3'). Los promotores de transcripción pueden incluir "promotores inducibles" (en los que la expresión de una secuencia de polinucleótidos relaciona de forma operativa con el promotor está inducida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), "promotores reprimibles" (en los que la expresión de una secuencia de polinucleótidos relaciona de forma operativa con el promotor está inducida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), y "promotores constitutivos".

Los ácidos nucleicos incorporados en la presente invención pueden estar "unidos de forma operativa" entre sí o unidos a una proteína o péptido. Como se usa en el presente documento, "unido de forma operativa" se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes descritos de ese modo se configuran de manera que puedan realizar su función habitual. Por lo tanto, las secuencias de control unidas de forma operativa a una secuencia codificante son capaces de efectuar la expresión de la secuencia codificante. No es necesario que las secuencias de control sean contiguas a la secuencia codificante, siempre y cuando funcionen para dirigir su expresión. Por lo tanto, por ejemplo, las secuencias intermedias no traducidas aunque transcritas pueden estar presentes entre una secuencia promotora y la secuencia codificante y aún se puede considerar que la secuencia promotora está "unida de forma operativa" a la secuencia codificante.

"Sinérgico" o tener "sinergia" se refiere a una actividad de administrar combinaciones de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, o compuestos químicos que es superior a la actividad aditiva de las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos o compuestos químicos si se administran de forma individual.

Las realizaciones de la presente invención se pueden "coadministrar", lo que se refiere a dos o más proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, o compuestos químicos de una combinación que se administran de manera que los efectos terapéuticos o profilácticos de la combinación son superiores al efecto terapéutico de cualquiera de las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, o compuestos químicos administrados solos. Las dos o más proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, o compuestos químicos se pueden administrar de forma simultánea o de forma secuencial. Las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos o compuestos químicos coadministrados de forma simultánea se pueden proporcionar en una o más composiciones farmacéuticamente aceptables. La coadministración secuencial incluye, pero no se limita a, casos en los que las proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, carbohidratos, o compuestos químicos se administran de un modo tal que cada proteína, lípido, ácido nucleico, carbohidrato, o compuesto químico pueda estar presente en el sitio de tratamiento al mismo tiempo.

Otro aspecto de la presente invención administra un "adyuvante" o equivalentes del mismo, lo que se refiere a un compuesto o mezcla que mejora la respuesta inmunológica a un antígeno. Un adyuvante puede servir como un depósito de tejido que libera el antígeno lentamente y también como un activador del sistema linfóide que no aumenta la respuesta inmune de forma específica. A menudo, una estimulación primaria solamente con un antígeno, en ausencia de un adyuvante, no conseguirá obtener una respuesta inmunológica humoral o celular. Los adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund completo, adyuvante de Freund incompleto, saponina, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias activas superficiales tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite o hidrocarburo, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Preferentemente, el adyuvante es farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto relacionado, la expresión "adyuvante molecular" se define como una proteína, lípido, ácido nucleico, carbohidrato, o compuesto químico para el que las células dendríticas (DC), macrófagos, linfocitos B, linfocitos T, y/o linfocitos NK tienen un receptor conocido cuya ocupación conduce a una secuencia definida de transducción de señales intracelulares y un cambio en el fenotipo dando como resultado una mejora en la cantidad o calidad de la respuesta inmunológica resultante. En un aspecto relacionado, las células, como se ha descrito anteriormente, de forma colectiva se denominan "células inmunes".

Los polinucleótidos que se describen en el presente documento codifican un "polipéptido", por ejemplo, SERCA2 o isómeros del mismo. "Polipéptido" se usa en su sentido convencional, es decir, como una secuencia de aminoácidos. Los polipéptidos no están limitados a una longitud específica del producto; por lo tanto, los péptidos, oligopéptidos y proteínas están incluidos dentro de la definición de polipéptido, y dichos términos se pueden usar indistintamente en el presente documento a menos que se indique lo contrario de forma específica. Este término tampoco hace referencia o excluye modificaciones posteriores a la expresión del polipéptido, por ejemplo, glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como de origen no natural. Un polipéptido puede ser una proteína completa, o una subsecuencia de la misma. Los polipéptidos de interés en particular en el contexto de la presente invención son subsecuencias de aminoácidos que comprenden epítopos, es decir, determinantes antigénicos sustancialmente responsables de las propiedades inmunogénicas de un polipéptido y que son capaces de evocar una respuesta inmunológica.

Por consiguiente, la presente invención utiliza polinucleótidos que codifican un polipéptido denominado isoforma 2a de Ca<sup>2+</sup>-ATPasa del Reticulo Sarcoplasmático (SERCA2a). SERCA reside en el retículo sarcoplasmático (SR) dentro de las células musculares. Se informa que la vasoconstricción (por ejemplo, células del músculo liso vascular o VSMC) depende de la movilización de Ca<sup>2+</sup> desde los almacenes intracelulares del SR. SERCA es una Ca<sup>2+</sup> ATPasa que transfiere Ca<sup>2+</sup> desde el citosol de la célula hasta el lumen del retículo sarcoplasmático (SR) a expensas de la hidrólisis del ATP. Las proteínas SERCA están codificadas por tres genes (SERCA 1, 2 y 3) situados en cromosomas separados. Las transcripciones de SERCA se expresan y como alternativa se cortan y empalman de una manera dependiente del tejido. Las especies de ARNm resultantes codifican diferentes isoformas de proteína SERCA y difieren en las regiones sin traducir en la posición 3' (UTR). Las isoformas de la proteína SERCA se diferencian en su afinidad por their Ca<sup>2+</sup>, resistencia al estrés oxidativo y modulación por sarcolipin, sarcolipina fosfolambano (PLB/PLN), y Ca<sup>2+</sup>/calmodulina quinasa II.

En una realización, los polipéptidos se definen por dominios estructurales. Por ejemplo, el dominio de señalización, que está asociado con la transducción después de la unión del receptor y se encuentra en el compartimento citoplasmático de las células, se define como una región de una molécula de proteína delimitada basándose en la función y está relacionado con un sustrato citoplásmico de un receptor.

En otro aspecto, la presente invención usa variantes de las composiciones polipeptídicas que se describen en el presente documento. Las variantes de polipéptidos incluidas generalmente en la presente invención presentarán de forma habitual una identidad de al menos aproximadamente un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o un 99 % o superior, a lo largo de su longitud, con respecto a una secuencia polipeptídica establecida en el presente documento.

Los polipéptidos SERCA2, incluyen pero no se limitan a, secuencias de GenBank humanas tales como AAB29701 (Wuytack *et al.*, J Biol Chem (1994) 269 (2): 1410-1416); NP\_733765 (Lytton y MacLennan, J Biol Chem (1988) 263 (29): 15023-15031); NP\_001672 (Otsu *et al.*, Genomics (1993) 17 (2): 507-509); AAH35588 (Strausberg *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (2002) 99 (26): 16899-16903); y secuencias de GenBank de ratón incluyendo AAD01889 (véase Heyen *et al.*, Mamm Genome (2000) 11 (2): 159-163); NP\_033852 (Hsu *et al.*, Biochem Biophys Res Comm (1993) 197 (3): 1483-1491); CAB41018 (véase Heyen *et al.*, Mamm Genome (2000) 11 (2): 159-163); CAB41017 (Id.); CAB72436 (Id.); CAA11450 (Id.); AAH54531 (Strausberg *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (2002) 99 (26): 16899-16903); AAH54748 (Id.); y otras especies incluyendo NP\_957259 (Ebert *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (2005) 102 (49): 17705-17710); ABG90496 (Wu *et al.*, *Silurus lanzhouensis* SERCA2, presentación directa (23 de junio de 2006), Departamento de Química Aplicada, College of Science, China Agricultural University, N.º 2, Yuanmigyuan West Road, Haidian, Beijing, 100094, China); NP\_001025448 (Sehra H., *Danio rerio* SERCA2, presentación directa (7-AUG-2005), Welcome Trust Sanger Institute, Hixton, Cambridgeshire, CB10 1SA, UK); NP\_001009216 (Gambel

*et al.*, Biochem Biophys Acta (1992) 1131 (2): 203-206); NP\_999030 (Eggermont *et al.*, Biochem J (1989) 260 (3): 757-761); NP\_058986 (Guntjeski-Hamblin *et al.*, J Biol Chem (1988) 263 (29): 15032-15040); CAA37784 (Eggermont *et al.*, Biochem J (1989) 260 (3): 757-761); y CAA37783 (Id.). Todas las secuencias mencionadas anteriormente están disponibles al público.

5 En otras realizaciones ilustrativas, un polipéptido SERCA2 puede ser un polipéptido de fusión que comprende múltiples polipéptidos SERCA2 como se describe en el presente documento, o que comprende al menos un polipéptido SERCA2 como se describe en el presente documento y una secuencia no relacionada, tal como una proteína vírica conocida. Un compañero de fusión puede, por ejemplo, ayudar a proporcionar epítomos (un  
10 compañero de fusión inmunológico), preferentemente epítomos reconocidos por seres humanos, o puede ayudar a expresar la proteína (un potenciador de expresión) con mayores rendimientos que la proteína recombinante nativa. Ciertos socios de fusión mejoran la formación de multímeros.

15 Los polipéptidos de fusión por lo general se pueden preparar usando técnicas convencionales, incluyendo la conjugación química. Preferentemente, un polipéptido de fusión SERCA2 se expresa como un polipéptido recombinante, permitiendo la producción de niveles aumentados de SERCA2, en relación con un polipéptido no fusionado, en un sistema de expresión. En resumen, las secuencias de ADN que codifican los componentes polipeptídicos se pueden ensamblar por separado, y se pueden ligar en un vector de expresión apropiado. El extremo en la posición 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente polipeptídico se liga, con o sin un  
20 conector peptídico, al extremo en la posición 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente polipeptídico de modo que los marcos de lectura de las secuencias estén en fase. Esto permite la traducción en un único polipéptido de fusión que retiene la actividad biológica de ambos polipéptidos componentes.

25 La presente invención también incluye "péptido" o "porción de péptido" o "fragmento" o "fragmento de péptido" y equivalentes de los mismos, que se usan ampliamente en el presente documento para hacer referencia a dos o más aminoácidos unidos por un enlace peptídico. La expresión "fragmento proteolítico" también se usa en el presente documento para hacer referencia a un producto que se puede producir mediante una reacción proteolítica sobre un polipéptido, es decir, un péptido producido por escisión de un enlace peptídico en el polipéptido. Aunque la expresión "fragmento proteolítico" por lo general se usa en el presente documento para hacer referencia a un  
30 péptido que se puede producir mediante una reacción proteolítica, se debería reconocer que no es necesario que el fragmento se produzca mediante por una reacción proteolítica, sino que también se puede producir usando métodos de síntesis química o métodos de tecnología de ADN recombinante, como se discute con mayor detalle a continuación, para producir un péptido sintético que es equivalente a un fragmento proteolítico.

35 Además, la expresión "fragmento funcional" o "porción funcional" o equivalentes de las mismas se refiere a que el fragmento o péptido de SERCA2 tiene actividad funcional de SERCA2, por ejemplo, un fragmento funcional o fragmento proteolítico funcional de SERCA2 o SERCA2a tiene una actividad funcional de SERCA2 o SERCA2a.

40 Por lo general, un péptido contiene al menos aproximadamente seis aminoácidos, normalmente contiene unos diez aminoácidos y puede contener quince o más aminoácidos, en particular veinte o más aminoácidos. Se debería reconocer que el término "péptido" no se utiliza en el presente documento para sugerir un tamaño o número de aminoácidos en particular que comprende la molécula, y que un péptido de la invención puede contener hasta varios restos de aminoácidos o más.

45 Además, como se usa en el presente documento, el "producto de traducción" o "polipéptido" se refiere a péptidos, polipéptidos, oligopéptidos y proteínas o fragmentos de proteínas que tienen un efecto biológico deseado *in vivo* o *in vitro*. Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" se refiere a una molécula o cualquier subconjunto de péptidos de la molécula; mientras que una "variante" de una molécula de ese tipo se refiere a una molécula natural (por ejemplo, isoforma tal como SERCA2a) sustancialmente similar a la molécula entera, o a un  
50 fragmento de la misma. Por el contrario, un "análogo" de una molécula se refiere a una molécula no natural sustancialmente similar a la molécula entera o a un fragmento de la misma. Todos estos se contemplan en el presente documento siempre y cuando la administración *in vivo* de la composición terapéutica que contiene el polipéptido SERCA2, fragmento, o variante a un sujeto que padece de hipertensión pulmonar mejore o trate de forma eficaz al sujeto con necesidad del mismo.

55 Una secuencia de conector peptídico se puede usar para separar el primer y segundo componentes polipeptídicos con una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliegue en sus estructuras secundarias y terciarias. Una secuencia de conector peptídico de este tipo se incorpora en el polipéptido de fusión usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica. Las secuencias de conector peptídico adecuadas se pueden elegir basándose en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que pudiera interactuar con epítomos funcionales sobre el  
60 primer y el segundo polipéptidos; y (3) la falta de restos hidrófobos o cargados que pudieran reaccionar con los epítomos funcionales de polipéptido. Las secuencias de conector peptídico preferentes contienen restos de Gly, Asn, y Ser. Otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala también se pueden usar en la secuencia conectora. Por lo general, en la técnica se conocen algunas secuencias de aminoácidos que se pueden usar de forma útil. La secuencia conectora por lo general puede tener una longitud de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos. Las  
65

secuencias colectoras no son necesarias cuando el primer y el segundo polipéptidos tienen regiones de aminoácidos N-terminales no esenciales que se pueden usar para separar los dominios funcionales y prevenir la interferencia estérica.

5 Las secuencias de ADN ligadas están unidas de forma operativa a elementos reguladores de la transcripción de la traducción adecuados. Los elementos reguladores responsables de la expresión del ADN están situados solo en la posición 5' de la secuencia de ADN que codifica los primeros polipéptidos. De forma análoga, los codones de parada requeridos para terminar la traducción y las señales de terminación de la transcripción solo están presentes en la secuencia de ADN que codifica el polipéptido secundario, terciario, cuaternario, etc., (es decir, un codón de parada  
10 estará presente en el polipéptido final dependiendo del número de polipéptidos distintos que componen una molécula de proteína quimérica).

Además de los polipéptidos SERCA2, la presente divulgación proporciona composiciones de polinucleótidos que contienen SERCA2 y SERCA2. Los términos "ADN" y "polinucleótido" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a una molécula de ADN que se ha aislado libre de ADN genómico total de una especie en particular. "Aislado", como se usa en el presente documento, se refiere al que un polinucleótido está sustancialmente alejado de otras secuencias codificantes, y que la molécula de ADN no contiene grandes porciones de ADN codificante no relacionado, tales como grandes fragmentos cromosómicos u otros genes funcionales o polipéptido codificante es de polipéptidos. Por supuesto, esto se refiere a la molécula de ADN tal como se aísla originalmente, y no excluye genes o regiones codificantes añadidos posteriormente al segmento por la mano del hombre.

La expresión "gen de SERCA2" o "transgén de SERCA2" u otros isómeros de SERCA de los mismos, se refiere a un ADN o ARN y puede incluir hebras sentido y antisentido según sea apropiado para los objetivos de la terapia practicada de acuerdo con la invención. Además, como se usa en el presente documento, "polinucleótido" se refiere a un polímero de desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos, en forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción más grande. Los polinucleótidos de la invención incluyen derivados funcionales de polinucleótidos conocidos que codifican de forma operativa la proteína SERCA2a.

30 La secuencia de polinucleótidos se puede deducir a partir del código genético, sin embargo, la degeneración del código se debe tener en cuenta. Los polinucleótidos útiles en la invención incluyen secuencias que se degeneran como resultado del código genético, secuencias que los expertos en la materia pueden determinar fácilmente.

Además, el término "heterólogo" dado que se refiere a secuencias de ácidos nucleicos tales como secuencias codificantes y secuencias de control, representa secuencias normalmente no se unen entre sí y/o normalmente no se asocian con una célula en particular. Por lo tanto, una región "heteróloga" de una construcción de ácido nucleico o un vector es un segmento de ácido nucleico que está dentro o se une a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra en asociación con la otra molécula en naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de una construcción de ácido nucleico podría incluir una secuencia codificante flanqueada por secuencias no encontradas en asociación con la secuencia codificante en naturaleza. Otro ejemplo de una secuencia codificante heteróloga es una construcción en la que la secuencia codificante por sí misma no se encuentra en naturaleza (por ejemplo, secuencias sintéticas que tienen codones diferentes del gen nativo). De forma análoga, una célula transformada con una construcción que normalmente no está presente en la célula se podría considerar heteróloga para fines de la presente invención. La variación alélica o los sucesos mutacionales de origen natural no dan lugar a ADN heterólogo, como se usa en el presente documento.

Por consiguiente, una "secuencia codificante" o una secuencia que "codifica" una proteína en particular, es una secuencia de ácidos nucleicos que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan mediante un codón de iniciación en el extremo en la posición 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo en la posición 3' (carboxi). Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, ADNc de ARNm procariota o eucariótica, secuencias de ADN genómico de ADN procariótico o eucariótico e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción normalmente se situará en la posición 3' con respecto a la secuencia codificante.

La secuencia de nucleótidos del SERCA2 y sus isoformas está conservada en aproximadamente un 90 %+ entre especies de mamíferos. Por lo tanto, SERCA2 se ha identificado y secuenciado a partir de diversas especies de mamíferos, incluyendo las secuencias de GenBank humanas NM\_170665 (Lytton y MacLennan, J Biol Chem (1998) 263 (29): 15024-15031); NM\_001681 (Id.); NM\_006241 (Park *et al.*, J Biol Chem (1994) 269 (2): 944-954); NM\_001003214 (Autry y Jones, J Biol Chem (1997) 272 (25): 15872-15880); BC035588 (Strausberg *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (2002) 99 (26): 16899-16903); AY186578 (Gelebart *et al.*, Biochem Biophys Res Comm (2003) 303 (2): 676-684); y secuencias de GenBank de ratón NM\_026482 (Du *et al.*, Arch Biochem Biophys (1995) 316 (1): 302-310); NM\_213616 (Hunter *et al.*, Genomics (1993) 18 (3): 510-519); NM\_009722 (Hsu *et al.*, Biochem Biophys Res Comm (1993) 197 (3): 1483-1491); AJ131870 (véase Heyen *et al.*, Mamm Genome (2000) 11 (2): 159-163); BC054531 (Strausberg *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA (2002) 99 (26): 16899-16903); BC054748 (Id.); AJ131821 (véase Heyen *et al.*, Mamm Genome (2000) 11 (2): 159-163); AJ223584 (Id.); AF029982 (Id.); y AF039893

(Schoenfeld y Lowe, presentación directa (18 de diciembre de 1997), Cardiovascular Research, Genentech, 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, USA). Todas las secuencias anteriores están disponibles al público.

5 Aunque los expertos en la materia reconocerán que el uso del polinucleótido de SERCA2a humano podría ser preferente en terapias humanas, por ejemplo, terapias genéticas humanas, el polinucleótido de SERCA2a de rata también se puede usar para los fines de la invención que se describen en el presente documento. Por lo tanto, los polinucleótidos que son estructural o funcionalmente similares, por ejemplo, altamente homólogos con respecto al SERCA2a humano están incluidos dentro de la invención.

10 Para un experto en la materia será evidente que para obtener y usar secuencias de SERCA2 incluidas en la presente divulgación y las conocidas en la técnica, el ADN y el ARN también se pueden sintetizar usando síntesis de ácidos nucleicos automatizada con cualquier método conocido hasta la fecha o descubierto posteriormente (por ejemplo, PCR, síntesis de ADNc (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 2001, y Current Protocols in Molecular Biology, M. Ausubel *et al.*, eds., (Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Suplemento más reciente)).

20 Como entenderán los expertos en la materia, las composiciones de polinucleótidos útiles en la presente invención pueden incluir secuencias genómicas, secuencias extragenómicas y codificadas en plásmidos y segmentos genéticos modificados por ingeniería más pequeños que expresan, o que se pueden adaptar para que expresen, proteínas, polipéptidos, péptidos y similares. Los segmentos de este tipo se pueden aislar de forma natural, o se puede modificar por vía sintética por la mano del hombre.

25 Como también reconocerá un experto en la materia, los polinucleótidos útiles en la invención pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden ser ADN (genómico, ADNc o sintético) o moléculas de ARN. Las moléculas de ARN pueden incluir moléculas de HnARN, que contienen intrones y que corresponden a una molécula de ADN en una molécula de una manera exclusiva, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Pueden estar presentes, pero no necesariamente, secuencias codificantes o no codificantes adicionales dentro de un polinucleótido útil en la presente invención, y un polinucleótido puede, aunque no necesariamente, estar unido a otras moléculas y/o materiales de soporte.

35 Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica un polipéptido/proteína de la invención o una porción de los mismos) o puede comprender una secuencia que codifique una variante o derivado, incluyendo una variante o derivado inmunogénicos de dicha secuencia. Además, los polinucleótidos pueden codificar una combinación de diferentes secuencias, por ejemplo, un transgén, un polinucleótido vírico, un ácido nucleico que codifica un marcador seleccionable y similares.

40 Como se ha discutido anteriormente, los polipéptidos de de SERCA2 están altamente conservados, por lo que el experto en la materia puede realizar un alineamiento óptimo de las secuencias de polipéptidos o de ácidos nucleicos para su comparación usando el programa Megalign en el conjunto de software de bioinformática Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.), usando parámetros por defecto. Este programa incorpora varios esquemas de alineación que se describen en las siguientes referencias: Dayhoff, M. O. (1978) A model of evolutionary change in proteins -- Matrices for detecting distant relationships. En Dayhoff, M. O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington D.C. Vol. 5, Supl. 3, pp. 345-358; Hein J. (1990) Unified Approach to Alignment and Phylogenesis pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, Calif.; Higgins, D. G. y Sharp, P. M. (1989) CABIOS 5:151-153; Myers, E. W. y Muller W. (1988) CABIOS 4:11-17; Robinson, E. D. (1971) Comb. Theor 11:105; Saitou, N. Nei, M. (1987) Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. (1973) Numerical Taxonomy -- the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, Calif.; Wilbur, W. J. y Lipman, D. J. (1983) Proc. Natl. Acad., Sci. USA 80: 726-730.

50 Como alternativa, el alineamiento óptimo de las secuencias para comparación se puede realizar con el algoritmo de identidad local de Smith y Waterman (1981) Add. APL. Math 2: 482, con el algoritmo de alineamiento de identidad de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, mediante la búsqueda de métodos de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444, mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, y TFASTA en the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis.), o mediante inspección.

60 Un ejemplo de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y similitud de secuencias son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul *et al.*, (1977) Nucl. Acids Res. 25: 3389-3402 y en Altschul *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410, respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se pueden usar, por ejemplo con los parámetros que se describen en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencias de los polinucleótidos y polipéptidos que se desvelan en el presente documento. El software para realizar los análisis BLAST está disponible al público a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica. Para las secuencias de aminoácidos, para calcular la puntuación acumulada se puede usar una matriz de puntuación. La extensión de las coincidencias de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación

acumulativa va a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el final de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST, W, T y X, determinan la sensibilidad y la velocidad del alineamiento.

5 En las composiciones útiles en la presente invención, el polinucleótido o ácido nucleico puede ser cualquiera de ADN o ARN. Las secuencias en cuestión pueden ser de origen natural o artificial y, en particular, ADN genómico, ADNc, ARNm, ARNt, ARNr, secuencias híbridas o secuencias sintéticas o semisintéticas. Además, el ácido nucleico puede ser de tamaño muy variable, que va desde el oligonucleótido hasta el cromosoma. Estos ácidos nucleicos pueden ser de origen humano, animal, vegetal, bacteriano, vírico y similares. Se pueden obtener mediante cualquier técnica conocida por un experto en la materia, y en particular mediante la identificación sistemática de bibliotecas, mediante síntesis química o como alternativa con métodos mixtos que incluyen la modificación química o enzimática de secuencias obtenidas mediante la identificación sistemática de bibliotecas. Además, se pueden incorporar en vectores, tales como vectores plasmídicos.

15 Para expresar un polipéptido deseado, las secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido, por ejemplo, SERCA2, o equivalentes funcionales, se pueden insertar en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contenga los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Se pueden usar métodos que son bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control de la transcripción y de la traducción apropiados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Tales técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook, J. *et al.*, (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., y en Ausubel, F. M. *et al.*, (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York. N.Y.

25 La expresión "codificación de forma operativa" se refiere a un polinucleótido que se ha modificado para que incluya la secuencia de promotor y otras secuencias necesarias para la expresión y, cuando se desee, la secreción del producto de traducción deseado; por ejemplo, un péptido o proteína. Todas las realizaciones de la invención se pueden poner en práctica usando vectores de expresión de AAV conocidos. Preferentemente, estos vectores incluirán ADNc(s) que codifica el producto de traducción deseado. Por lo tanto, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se supondrá que "polinucleótido" se refiere a secuencias que codifican de forma operativa contenidas en un vector de expresión recombinante adecuado, ejemplos de las cuales se proporcionan en el presente documento.

35 Los "elementos de control" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión son aquellas regiones no traducidas del vector (por ejemplo, potenciadores, promotores, regiones sin traducir las posiciones 5' y 3' y similares), que interactúan con proteínas de células hospedadoras para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Los elementos de este tipo pueden variar en su fuerza y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y hospedador usados, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clonan sistemas bacterianos, se pueden usar promotores inducibles tales como el promotor híbrido lacZ del fagémido pBLUESCRIPT (Stratagene La Jolla, Calif.) o el plásmido pSPORT1 (Gibco BRL, Gaithersburg, Md.) y similares. En sistemas de células de mamíferos, por lo general se prefieren promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. A modo de ejemplos no limitantes, los promotores incluyen los de promotores de CMV, beta-actina, EF2alfa, LTR de RSV, LTR de VIH, LTR de HTLV-1 y promotores compuestos (D.H. Barouch *et al.*, *A human T-cell leukemia virus type 1 regulatory element enhances the immunogenicity of human immunodeficiency virus type 1 DNA vaccines in mice and nonhuman primates*, *J. Virol.* 79: 8828-8834, 2005). En un aspecto, el promotor es un promotor de CMV o un promotor que comprende porciones del promotor de beta-actina de pollo (H. Niwa *et al.*, *Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector*, *Gene* 108: 193-199, 1991). En otro aspecto, el promotor es un promotor de CMV, promotor de Sm22, o promotor de Tie2. Si es necesario generar una línea celular que contenga múltiples copias de la secuencia que codifica un polipéptido, de forma ventajosa se pueden usar vectores basados en based SV40 o EBV con un marcador seleccionable apropiado.

Las señales de iniciación específicas también se pueden usar para conseguir una traducción más eficaz de secuencias que codifican un polipéptido de interés. Las señales de este tipo incluyen el codón de iniciación de ATG y secuencias adyacentes. En los casos en los que las secuencias que codifican el polipéptido, su codón de iniciación y secuencias cadena arriba se insertan en el vector de expresión apropiado, no se necesitarán señales adicionales de control transcripcional o de traducción. Sin embargo, en los casos en los que solo se inserta la secuencia de codificación, o una parte de la misma, se deben proporcionar señales de control de traducción exógenas incluyendo el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación debe estar en el marco de lectura correcto para asegurar la traducción de toda la inserción. Los elementos de traducción exógenos y los codones de iniciación pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión se puede mejorar mediante la inclusión de potenciadores que sean apropiados para el sistema celular que se usa en particular, tales como los se describen en la bibliografía (Scharf, D. *et al.*, (1994) *Results Probl. Cell Differ.* 20: 125-162).

65 Además, una cepa de célula hospedadora se puede elegir por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada de la manera deseada. Tales modificaciones del

polipéptido incluyen, pero no se limita, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación. El procesamiento posterior a la traducción que escinde una forma "prepro" de la proteína también se puede usar para facilitar la inserción, plegamiento y/o función correctos. Se pueden elegir diferentes células hospedadoras tales como CHO, COS, HeLa, MDCK, HEK293 y WI38, que tengan una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para tales actividades posteriores a la traducción, para asegurar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña.

Además, la administración genética implica polímeros que forman complejos, nanopartículas (definidas como con un diámetro inferior a 1 micrómetro), o incluso micropartículas (definidas como con un diámetro superior a 1 micrómetro) con plásmidos de ADN y otros ácidos nucleicos. Se han descrito muchos tipos de polímeros que mejoran la expresión de genes codificados por ácidos nucleicos en las células.

Por ejemplo, los polímeros catiónicos tales como poli-L-lisina, poli-L-glutamato, o copolímeros en bloque también pueden ser agentes de administración de ácidos nucleicos. Además, se ha utilizado el uso de poli[ácido alfa-(4-aminobutil)-1-glicólico] (PAGA) para suministrar ADN de plásmido a ratones portadores de tumores. Además, también se ha descrito el uso de lipopolímero soluble en agua (WSP), usando polietilenimina ramificada y cloroformiato de colesterilo. Además se encontró la administración genética híbrida de polímero de vesícula basado en polietilenimina como otra forma de administrar vectores de expresión de ADN de plásmido, incluyendo el uso de dendrímeros de poli(propilenimina) como agentes de administración. Además se encontró que los copolímeros de polietilenglicol (PEG) mejoran la administración del ADN de plásmido DNA, incluyendo diversos tipos de polímeros que se pueden usar para la liberación controlada del ADN de plásmido y otros ácidos nucleicos. Las moléculas de este tipo incluyen poli(ácido láctico) y sus derivados, poli(ácido láctico) PEGilado, poli(ácido láctico-co-glicólico) y sus derivados, poli(orto ésteres) y sus derivados, poli(orto ésteres) PEGilados, poli(caprolactona) y sus derivados, poli(caprolactona) PEGilada, poli-lisina y sus derivados, polilisina PEGilada, poli(etilenimina) y sus derivados, poli(etilenimina) PEGilada, poli(ácido acrílico) y sus derivados, poli(ácido acrílico) PEGilado, poli(uretano) y sus derivados, poli(uretano) PEGilado, y combinaciones de todos los mismos. En el presente documento se desvela el uso de micropartículas poliméricas de lípido-proteína-azúcar para la administración de ácidos nucleicos. Estos y otros polímeros se conocen bien en la técnica.

Las composiciones de ácido nucleico se creen administrar mediante electroporación. La electroporación usa pulsos eléctricos para introducir proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, carbohidratos, o mezclas de los mismos en el hospedador para producir un efecto. Un uso habitual de la electroporación es introducir un ácido nucleico en el hospedador de manera que la proteína codificada por el ácido nucleico se produzca de forma eficaz.

Las composiciones de ácido nucleico se pueden administrar mediante bombardeo de partículas. Powderject (Novartis Pharmaceutical Corporation) ha desarrollado métodos para revestir partículas de oro con ácidos nucleicos y otras sustancias y a continuación introducirlas forzosamente en el hospedador mediante bombardeo de partículas. Para los ácidos nucleicos que codifican antígenos, esto da como resultado un aumento de la respuesta inmunológica con respecto a los antígenos.

La presente invención también incluye la administración de entidades y composiciones moleculares "farmacéuticamente aceptables" que se pueden tolerar fisiológicamente y por lo general no producen una reacción alérgica o reacción no deseada similar, tal como malestar gástrico, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano. Por lo tanto, como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o estatal o que se enumera en la Farmacopea de Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, vehículo con el que se administra el compuesto. Tales vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen en petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Las soluciones salinas de a solución en agua o acuosas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se emplean preferentemente como vehículos, en particular para soluciones inyectables. Algunos vehículos farmacéuticos aceptables se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin.

Por consiguiente, como se usa en el presente documento, la expresión "composición terapéutica" se define como la que comprende al menos un gen que codifica la isoforma 2a de SERCA (SERCA2a). La composición terapéutica también puede contener otras moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, un vector vírico) y entidades farmacéuticamente aceptables, y sustancias tales como agua, minerales, vehículos tales como proteínas y otros excipientes conocidos por un experto en la materia.

La invención se refiere a tratar o proporcionar tratamiento a un sujeto que padece hipertensión pulmonar. Como se usa en el presente documento, "tratar" o "tratamiento" del sujeto es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Los resultados clínicos deseados incluyen, pero no se limitan a, prevención de la remodelación de células de músculo liso en arterias pulmonares, restablecimiento de la función pulmonar, y/o reducción de la gravedad o inhibición de síntomas asociados con la hipertensión pulmonar. Los síntomas asociados con la hipertensión pulmonar a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, dolor de pecho, mareos, desmayos,

fatiga, hinchazón de las piernas, sensación de mareo durante el ejercicio o esfuerzo, dificultad para respirar durante la actividad y debilidad. Los beneficios o resultados clínicos deseados dependen del mecanismo, aunque el mecanismo de actividad está incluido dentro del resultado. Como entenderá una persona con experiencia en la materia, los síntomas particulares que conducen al tratamiento con la invención dependerán de la gravedad de la hipertensión pulmonar que se está tratando.

En un aspecto de la invención, la composición terapéutica usada para tratar la hipertensión pulmonar incluye un vector de expresión de AAV o virión de AAV y un gen que codifica la isoforma 2a de SERCA. Como se ha discutido previamente, el transgén SERCA2a de la invención, cuando está contenido en una composición terapéutica, por lo general se une de forma operativa a diversos elementos reguladores que se han modificado para que incluyan secuencias de promotor y otras secuencias necesarias para la expresión y, cuando se desee, la secreción del producto de traducción deseado (por ejemplo, un péptido o proteína). Por ejemplo, los polinucleótidos de SERCA2a se pueden conjugar o usar en asociación con otros polinucleótidos que codifican de forma operativa las proteínas reguladoras que controlan la expresión de estos polipéptidos o pueden contener secuencias de reconocimiento, promotoras y de secreción. Las personas con experiencia en la materia serán capaces de seleccionar polinucleótidos reguladores e incorporarlos en los polinucleótidos SERCA2a de la invención sin experimentación indebida.

Una composición terapéutica para tratar o reducir los síntomas asociados con la hipertensión pulmonar puede incluir un polinucleótido que codifica una proteína capaz de modular indirectamente el  $\text{Ca}^{2+}$  del músculo liso y la contractilidad. Como se sabe en la técnica, la proteína cardiaca fosfolambano inhibe la actividad de SERCA2a. Por consiguiente, en el presente documento se desvelan métodos para disminuir el nivel o la actividad del fosfolambano en una célula de músculo liso pulmonar. En una realización, la expresión de un mutante pseudofosforilado de fosfolambano aumenta. En otra realización, un mutante tiene sustitución del sitio de fosforilación 16 de serina con el aminoácido básico glutamina, introduciendo de ese modo una carga negativa en la posición 16 (mutante de fosfolambano S16E). Esta forma pseudofosforilada de fosfolambano compite con el fosfolambano natural para unirse a SERCA, disminuyendo de ese modo la oportunidad para que la proteína natural influya de forma negativa en la actividad de SERCA. Véase, por ejemplo, el documento WO 2000/025804.

En el presente documento se desvelan métodos que incluyen la administración, a un sujeto con necesidad del mismo, de una cantidad terapéuticamente eficaz de un ARNsi en un vector vírico, en la que el ARNi disminuye la expresión y/o actividad del fosfolambano (PLB), en una cantidad eficaz para transducir células del músculo liso pulmonar del sujeto, dando como resultado de ese modo la expresión del ARNi y para tratar la hipertensión pulmonar en el sujeto. El PLB no fosforilado mantiene baja la afinidad del  $\text{Ca}^{2+}$  de SERCA2a, lo que da como resultado una disminución de la absorción del  $\text{Ca}^{2+}$  del SR, una relajación más lenta y una reducción de la carga de  $\text{Ca}^{2+}$  del SR.

Los ácidos nucleicos de PLB, incluyen, pero no se limitan a, los N.º de Registro en GenBank NM\_02667 (Simmerman *et al.*, J Biol Chem (1986) 261 (28): 13333-13341); NM\_023129 (Ganim *et al.*, Cir Res (1992) 71 (5): 1021-1030); NM\_022707 (Wang y Nadal-Ginard, Adv Exp Med Biol (1991) 304: 387-395); BC134584 (Moore *et al.*, presentación directa (17-MAR-2007), BC Cancer Agency, Canada's Michael Smith Genome Sciences Centre, Suite 100, 570 West 7th Avenue, Vancouver, British Columbia V5Z 4S6, Canadá); y NM\_214213 (Verboomen *et al.*, Biochem J (1989) 262 (1): 353-356). Todas las secuencias mencionadas anteriormente están disponibles al público.

La expresión "ARN de interferencia" se refiere por lo general a un proceso en el que una molécula de ARN bicatenario cambia la expresión de una secuencia de ácido nucleico con la que la molécula de ARN de doble hebra ARN horquillado corto comparte una homología sustancial o total. Aunque no está ligado por la teoría, el mecanismo de acción puede incluir, pero no se limita, regulación cadena abajo directa o indirecta de la expresión del gen PLB, disminución del ARNm de PLB, y/o una disminución de la actividad PLB. El término "ARNi", incluyendo "ARN inhibidor corto (ARNsi)", se refiere a secuencias de ARN que provocan el ARN de interferencia, y que se transcribe a partir de un vector. Las expresiones "ARN horquillado corto" o "ARNhc" se refieren a una estructura de ARN que tiene una región dúplex y una región de lazo. También se debe entender que esta expresión es específica para las moléculas de ARN con estructuras secundarias de tallo-lazo o saliente. Los ARNi se pueden expresar inicialmente como los ARNsh.

Por lo general, el ARNi se optimiza con secuencias idénticas entre la diana y el ARNi. El fenómeno de ARN de interferencia se puede observar con una homología inferior a un 100 %, pero las regiones complementarias deben ser suficientemente homólogas entre sí para formar las regiones de hebra doble específicas. Las reglas estructurales precisas para conseguir una región de doble cadena eficaz para dar como resultado una ARN de interferencia no se han identificado completamente, pero por lo general es suficiente una identidad de aproximadamente un 70 %. Por consiguiente, en algunas realizaciones de la invención, la homología entre el ARNi y PLB tiene una identidad de secuencias de nucleótidos de al menos un 70 %, y puede tener una identidad de secuencias de nucleótidos de al menos un 75 %. La homología incluye, pero no se limita a, una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos un 85 % o una identidad de secuencias de nucleótidos de incluso un 90 %. En una realización, la homología de secuencias entre la secuencia diana y la hebra sentido del ARNi tiene una identidad de secuencias de nucleótidos de al menos un 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o un

100 %.

Otra consideración es que el emparejamiento de bases en el ARN es sutilmente diferente del ADN en que G se emparejará con U, aunque no tan fuertemente como lo hace con C, en dúplex de ARN. Además, para la eficacia de ARNi, es más importante que la cadena antisentido sea homóloga a la secuencia diana. En algunas circunstancias, se sabe que 17 de 21 nucleótidos son suficientes para iniciar el ARNi, pero en otras circunstancias, se requiere una identidad de 19 o 20 nucleótidos de 21. Aunque no está limitado por la teoría, a nivel general, se requiere mayor homología en la parte central de una región de doble cadena que en sus extremos. Un cierto grado predeterminado de falta de homología perfecta se puede diseñar en una construcción en particular para reducir su actividad de ARNi lo que podría dar como resultado un silenciamiento parcial o represión del producto del gen diana, en circunstancias en las que solo se buscaba un grado de silenciamiento. En tal caso, solo se pueden cambiar una o dos bases de la secuencia antisentido. Por otro lado, la hebra sentido es más tolerante a las mutaciones. Aunque no está limitado por la teoría, esto puede ser debido a que la cadena antisentido es la que es catalíticamente activa. Por lo tanto, menos identidad entre la cadena de sentido y la transcripción de una región de un gen diana no necesariamente reducirá la actividad del ARNi, en particular cuando la cadena antisentido se hibrida perfectamente con esa transcripción. Las mutaciones en la cadena sentido (de modo que no es idéntica a la transcripción de la región del gen diana) pueden ser útiles para ayudar en la secuenciación de construcciones horquilladas y potencialmente para otros fines, tales como la modulación del procesamiento del corte de una transcripción de horquilla u otros aspectos de la vía del ARNi.

Los términos "hibridación" y "emparejamiento", incluyendo equivalentes gramaticales de los mismos, se usan indistintamente en la presente memoria descriptiva con respecto a secuencias de nucleótidos y se refieren a secuencias de nucleótidos que son capaces de formar pares de bases de Watson-Crick debido a su complementariedad. La persona experta en la materia podría entender que también es posible el emparejamiento de pares de bases no Watson-Crick, especialmente en el contexto de las secuencias de ARN. Por ejemplo, un denominado "par oscilante" se puede formar entre restos de guanosina y uracilo en el ARN.

Los productos de expresión de ARN del casete de expresión de ARNi conducen a la generación de un complejo de ARN bicatenario (ARNds) para inducir la ARN de interferencia y, de ese modo regular cadena abajo o disminuir la expresión de un gen de mamífero. "ARNds" se refiere a un complejo de ácido ribonucleico que comprende dos cadenas de ARN complementarias con bases emparejadas de Watson-Crick. El complejo de ARNds comprende una primera secuencia de nucleótidos que se hibrida en condiciones rigurosas, incluyendo una etapa de lavado de 0,2 x SSC a 65 °C, a una secuencia de nucleótidos de al menos un gen de mamífero y una segunda secuencia de nucleótidos que es complementaria a la primera secuencia de nucleótidos. La primera secuencia de nucleótidos podría estar unida a la segunda secuencia de nucleótidos por una tercera secuencia de nucleótidos (por ejemplo, un lazo de ARN) de manera que la primera secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos formen parte de la misma molécula de ARN; como alternativa, la primera secuencia de nucleótidos podría ser parte de una molécula de ARN y la segunda secuencia de nucleótidos podría ser parte de otra molécula de ARN. Por lo tanto, se puede formar un complejo de ARNds mediante hibridación o emparejamiento intramolecular o el complejo de ARNds se forma por hibridación o emparejamiento intermolecular.

Además, otros ácidos nucleicos (transgenes) y proteínas de SERCA, fosfolambano, inhibidor-1 de la fosfatasa de tipo 1, S100A1 y sarcolipina, así como ácidos nucleicos y proteínas relacionados que desempeñan un papel en  $Ca^{2+}$ , son dianas para los polinucleótidos que se desvelan en el presente documento.

Por ejemplo, en un aspecto de la invención, un vector y transgén vírico es AAV2/1/SERCA2a, que está constituido por una cápside vírica del serotipo 1 de AAV que contiene un ADN de cadena sencilla de 4486 nucleótidos que contiene el casete de expresión SERCA2a humano flanqueado por las ITR obtenidas a partir del serotipo 2 de AAV. La cápside icosaédrica consta de tres proteínas de la cápside de serotipo 1 de AAV relacionadas, VP1, VP2 y VP3. El ADN de AAV2/1/SERCA2a contiene los siguientes componentes: ITR basada en serotipo 2 de AAV en los extremos en las posiciones 3' y 5' terminales, flanqueando el casete de expresión CMV-hSERCA2a-poliA. El casete de expresión contiene el potenciador/promotor temprano inmediato de citomegalovirus (CMVie) que conduce la transcripción de secuencias que incluyen un intrón híbrido del plásmido comercial pCI (Promega - GenBank U47119), el ADNc de hSERCA2A (secuencia codificante idéntica a GenBank NM-001681), y una señal de poliadenilación de hormona de crecimiento bovino (BGHpA, (GenBank M57764)). El intrón híbrido se diseñó usando el sitio donante en la posición 5' desde el primer intrón de la  $\beta$ -globina humana y el sitio aceptor en la posición 3' a partir del intrón situado entre el líder y el cuerpo de una región variable de cadena pesada del gen de la inmunoglobulina.

El vector o construcción AAV2/1/SERCA2a incorpora menos de 300 nucleótidos de las secuencias de AAV (wtAAV) de tipo silvestre en el genoma del vector. Las secuencias de wtAAV son las ITR obtenidas a partir del serotipo 2 de AAV que proporcionan en cis la señal de empaquetamiento que permite la inserción del ADN de SERCA2a en la cápside.

Los agentes terapéuticos, incluyendo polinucleótidos, polinucleótidos en combinación con un vector, tanto víricos como no víricos, tal como se ha discutido anteriormente, se pueden usar en la preparación de un medicamento para

el tratamiento de la enfermedad pulmonar (por ejemplo, hipertensión pulmonar) en el que el medicamento se administra por infusión directa en el sistema circulatorio o por administración intratraqueal o inhalación. Los procedimientos para la administración por inhalación se discuten por ejemplo en Moss, *et al.*, Human Gene Therapy, 18: 726-732 (agosto de 2007).

Las composiciones terapéuticas útiles en la presente invención se suministran a una "célula diana" o "célula hospedadora" o "tejido diana" y equivalentes de los mismos, que se refieren a la célula, tejido del hospedador en el que se busca la expresión del polinucleótido que codifica de forma operativa. Por ejemplo, las composiciones de SERCA2 vírico adeno-asociado se administran en una célula muscular o tejido muscular.

En el presente documento se desvela el empaquetamiento de los viriones de AAV-SERCA2 como se ha discutido anteriormente. El crecimiento y propagación de los viriones requerirá "condiciones de medio definido", que se refieren a entornos para el cultivo de células en los que se detalla la concentración de componentes en los mismos requerida para un crecimiento óptimo. Por ejemplo, dependiendo del uso de las células (por ejemplo, aplicaciones terapéuticas), la eliminación de las células de las condiciones que contienen proteínas xenogénicas son importantes; es decir, las condiciones de cultivo por lo general son condiciones sin animales o sin proteínas animales no humanas.

La presente invención proporciona vectores de expresión de AAV o viriones rAAV para su uso en el tratamiento de "hipertensión pulmonar", que por lo general se refiere a una presión sanguínea anormalmente elevada en las arterias de los pulmones. Hace que el lado derecho del corazón necesita trabajar con más esfuerzo de lo normal.

La hipertensión pulmonar, como se describe en el presente documento, se diagnostica comúnmente usando una diversidad de métodos, incluyendo un examen físico realizado para buscar algunos signos habituales de hipertensión pulmonar. En este examen un médico busca sonidos cardíacos alterados, tales como una S<sub>2</sub> ampliamente separada o segundo sonido del corazón, un fuerte sonido P<sub>2</sub> o cierre de la válvula pulmonar (parte del segundo sonido cardíaco), jadeo (para)esternal, posible S<sub>3</sub> o tercer sonido cardíaco, y regurgitación pulmonar. Para confirmar la presencia de hipertensión pulmonar y excluir otros posibles diagnósticos se necesitan procedimientos adicionales. Por lo general, estos incluyen pruebas de función pulmonar; análisis de sangre para excluir VIH, enfermedades autoinmunes, y enfermedad hepática; electrocardiograma (ECG); mediciones de gas en sangre arterial; rayos X del tórax (seguido de barrido CT de alta resolución si se sospecha de enfermedad pulmonar intersticial); y ventilación-perfusión o exploración V/Q para excluir la hipertensión pulmonar tromboembólica crónica. La biopsia del pulmón no suele estar indicada a menos que se considere que la hipertensión pulmonar se debe a una enfermedad pulmonar intersticial subyacente. Pero las biopsias de pulmón presentan multitud de riesgos de hemorragia debido a la alta presión sanguínea intrapulmonar. La mejoría clínica a menudo se mide con un "ensayo de seis minutos de marcha", es decir, la distancia que un paciente puede caminar en seis minutos. La estabilidad y la mejora de esta medida se correlacionan con una mejor supervivencia. En la actualidad también se está usando el nivel de BNP en sangre para seguir la evolución de los pacientes con hipertensión pulmonar.

En un aspecto relacionado, las composiciones terapéuticas de la presente invención se administran un sujeto como una modalidad de mejora. Como se usa en el presente documento, "de mejora", se refiere a que mejora o alivia los síntomas de un sujeto asociados con un trastorno, e incluye la cura de un trastorno de ese tipo.

Se entenderá que, si se desea, una composición, como se desvela en el presente documento, se puede administrar en combinación con otros agentes así como, tal como, *por ejemplo*, otras proteínas o polipéptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos. De hecho, prácticamente no hay límite para otros componentes que también se puedan incluir, dado que los agentes adicionales no causan un efecto significativo adverso después del contacto con las células diana o tejidos hospedadores. De este modo, las composiciones se pueden administrar en combinación con otros agentes si fuera necesario en el caso en particular. Las composiciones de este tipo se pueden purificar a partir de células hospedadoras u otras fuentes biológicas, o como alternativa se pueden sintetizar por vía química como se describe en el presente documento. De forma análoga, las composiciones de este tipo pueden comprender adicionalmente composiciones de ARN o ADN sustituido o derivatizado.

Será evidente que cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento puede contener sales farmacéuticamente aceptables de los polinucleótidos y polipéptidos de la invención. Las sales de este tipo se pueden preparar, por ejemplo, a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases orgánicas (*por ejemplo*, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias y aminoácidos básicos) y bases inorgánicas (*por ejemplo*, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio).

Previamente se describieron realizaciones que describen sistemas víricos adeno-asociados y vectores de expresión. Sin embargo, el término "vector" se refiere a cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que es capaz de replicación cuando se asocia con los elementos de control apropiados y que puede transferir secuencias genéticas entre células. Por lo tanto, el término incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores víricos discutidos previamente v. De forma análoga, "vector de expresión recombinante" se refiere a sistemas de polinucleótido(s) que codifican de manera operativa polipéptidos expresables en eucariotas o procariotas. Los métodos para expresar secuencias de ADN que tienen secuencias eucariotas o

víricas en procariotas se conocen bien en la técnica. En la técnica también se conocen bien los vectores de ADN vírico y plásmido biológicamente funcionales capaces de expresión y replicación en un hospedador. Los hospedadores pueden incluir organismos microbianos, levaduras, insectos y mamíferos.

5 Los vectores o vectores de expresión recombinantes proporcionados en el presente documento se preparan fácilmente y combinan las ventajas de los adenovirus (alta titulación, capacidad de infección elevada, capacidad grande, falta de asociación con neoplasia humana) pero con la capacidad de integración de AAV, haciendo que sean particularmente adecuados para la transferencia genética estable que es útil, por ejemplo, en enfoques de terapia genética tal como se describe en el presente documento. Una ventaja adicional de los vectores AAV descritos es que, debido a que contiene TR o ITR de AAV y secuencias D que flanquean el gen de interés, se espera que se integren en el ADN cromosómico celular. La integración es importante para transferencia genética estable en células. Por lo tanto, los vectores AAV descritos en el presente documento son preferentes, por ejemplo, con respecto a vectores de adenovirus, ya que son episómicos y se podrían perder después de varias divisiones celulares. Otra ventaja de los vectores AAV proporcionados en el presente documento es que se empaquetan de forma eficaz en partículas de virus estables aunque se usen polinucleótidos pequeños o grandes. Además, otra ventaja de los vectores AAV proporcionados en el presente documento es que son menos citotóxicos que los vectores de adenovirus de primera generación ya que no se expresan genes de adenovirus dentro de las células translúcidas.

20 Los viriones que contienen vector AAV y/o AAV-SERCA2 descritos en el presente documento se "transfectan", lo que se refiere a la absorción del ADN extraño por una célula. Es decir, una célula se "transfecta" con ADN exógeno y el ADN se introduce dentro de la membrana celular. Por lo general en la técnica se conoce un número de técnicas de transfección. Véase, *por ejemplo*, Graham *et al.*, (1973) *Virology*, 52: 456, Sambrook *et al.*, (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis *et al.*, (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, y Chu *et al.*, (1981) *Gene* 13: 197. Las técnicas de este tipo se pueden usar para introducir uno o más restos de ADN exógeno, tales como un vector de integración de nucleótido y otras moléculas de ácido nucleico, en células hospedadoras adecuadas.

30 La expresión "celular hospedadora" u "hospedador" se refiere a, por ejemplo, células de mamífero, que se pueden usar, o se han usado como receptores de una construcción auxiliar de AAV, un plásmido de vector AAV, un vector de función auxiliar, u otro ADN de transferencia. De forma análoga, los términos "sujeto", "individuo" o "paciente" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a un vertebrado, preferentemente un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a, murinos, simios, seres humanos, animales de granja, animales para deportes y mascotas. El término incluye la progenie de la célula original que se ha transfectado. Por lo tanto, una "celular hospedadora" u "hospedador", como se usa en el presente documento, por lo general se refiere a una célula que se ha transfectado con una secuencia de ADN exógeno. Se entiende que la progenie de una sola célula progenitora puede no necesariamente puede tener una morfología completamente idéntica o en complemento de ADN genómico o total como el progenitor original, debido a mutación natural, accidental, o deliberada.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "línea celular" se refiere a una población de es capaz de crecimiento y división continuos o prolongados *in vitro*. A menudo, las líneas celulares son poblaciones clonales obtenidas a partir de una sola célula progenitora. Además, en la técnica se sabe que se pueden producir cambios espontáneos o inducidos en el cariotipo durante el almacenamiento o transferencia de las poblaciones clonales de este tipo. Por lo tanto, las células obtenidas a partir de la línea celular mencionada pueden no ser precisamente idénticas a las células o cultivos ancestrales, y la línea celular mencionada para incluir las variantes de este tipo.

50 Los vectores víricos adicionales útiles para suministrar los polinucleótidos que codifican polipéptidos desvelados en el presente documento mediante transferencia genética incluyen los obtenidos a partir de la familia de virus de la viruela, tales como virus vaccinia y virus de la viruela aviar. A modo de ejemplo, los recombinantes del virus vaccinia que expresan las nuevas moléculas se pueden construir como sigue a continuación. El ADN que codifica un polipéptido se inserta primero en un vector apropiado de manera que quede adyacente a un promotor de vaccinia y secuencias de ADN de vaccinia flanqueante, tal como la secuencia que codifica la timidina quinasa (TK). A continuación, este vector se usa para transfectar células que se infectan de forma simultánea con vaccinia. La recombinación homóloga sirve para insertar el promotor de vaccinia más el gen que codifica el polipéptido de interés en el genoma vírico. El recombinante TK<sup>(-)</sup> resultante se puede seleccionar cultivando las células en presencia de 5-bromodesoxiuridina y recogiendo placas víricas resistentes a la misma.

60 Un sistema de infección/transfección basado en vaccinia se puede usar de forma conveniente para proporcionar expresión o coexpresión transitoria, inducible de una o más polipéptidos que se describen en el presente documento en células hospedadoras de un organismo. En este sistema en particular, las células se infectan primero *in vitro* con un virus vaccinia recombinante que codifica la ARN polimerasa de T7 de bacteriófago. Esta polimerasa muestra una especificidad excelente porque solo transcribe moldes que portan promotores de T7. Después de la infección, las células se transfectan con el polinucleótido o polinucleótidos de interés, impulsado por un promotor T7. La polimerasa expresada en el citoplasma del recombinante del virus vaccinia transcribe el ADN transfectado en ARN que a continuación se traduce en polipéptido mediante la maquinaria de traducción del hospedador. El método proporciona producción citoplásmica transitoria de alto nivel de grandes cantidades de ARN y sus productos de

traducción. Véase, por ejemplo, Elroy-Stein y Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87: 6743-6747; Fuerst *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83: 8122-8126.

5 Como alternativa, los virus de la viruela aviar, tales como la viruela de aves de corral y virus de la viruela del canario, también se pueden usar para suministrar las secuencias codificantes de interés. Se sabe que los virus de la viruela aviar recombinantes, que expresan inmunógenos de agentes patógenos de mamífero, confieren inmunidad protectora cuando se administran a especies no aviares. El uso de un vector de Avipox es particularmente deseable en seres humanos y otras especies de mamíferos, ya que los miembros del género Avipox solo se pueden replicar de forma productiva en especies aviares susceptibles y por lo tanto no son infecciosos en células de mamífero. Los  
10 métodos para producir virus de la viruela aviar recombinantes se conocen en la técnica y emplean recombinación genética, con respecto a la producción de virus vaccinia. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 91/12882; WO 89/03429; y WO 92/03545.

15 Cualquiera de un número de vectores de alfavirus también se puede usar para el suministro de composiciones de polinucleótidos de la presente invención, tales como los vectores que se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 5.843.723; 6.015.686; 6.008.035 y 6.015.694. También se pueden usar ciertos vectores basados en la Encefalitis Equina Venezolana (VEE), ejemplos ilustrativos de los cuales se pueden encontrar en los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 5.505.947 y 5.643.576.

20 Además, para administración genética bajo la invención también se pueden usar vectores conjugados moleculares, tales como los vectores quiméricos de adenovirus que se describen en Michael *et al.*, J. Biol. Chem. (1993) 268: 6866-6869 y Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1992) 89: 6099-6103.

25 En ciertas realizaciones, un polinucleótido se puede integrar en el genoma de una célula diana. Esta integración se puede situar en la localización y orientación específicas mediante recombinación homóloga (sustitución genética) o se puede integrar en una localización aleatoria no específica (aumento genético). Además, en realización adicionales, el polinucleótido se puede mantener de forma estable en la célula como un segmento episómico de ADN. Los segmentos de polinucleótidos o "episomas" de este tipo codifican secuencias suficientes para permitir el mantenimiento y la replicación independiente o en sincronización con el ciclo de la célula hospedadora. La forma en  
30 que la construcción de expresión se suministra a una célula y en qué sitio permanece el polinucleótido en la célula depende del tipo de construcción de expresión empleada.

35 En una realización relacionada, otros dispositivos y métodos que pueden ser útiles para inyección sin aguja accionada por gas de composiciones de la presente invención incluyen los proporcionados Bioject, Inc. (Portland, Oreg.), algunos ejemplos de los cuales se describen en los documentos de Patente de Estados Unidos N.º 4.790.824; 5.064.413; 5.312.335; 5.383.851; 5.399.163; 5.520.639 y 5.993.412.

40 La presente invención se suministrar de diversos modos. Para la administración oral las composiciones de la presente invención se pueden incorporar como alternativa con uno o más excipientes en forma de un enjuague bucal, dentífrico, comprimido bucal, pulverización oral o una formulación sublingual administrada por vía oral. Como alternativa, el principio activo se puede incorporar en una solución oral tal como una que contiene borato sódico, glicerina y bicarbonato potásico, o se puede dispersar en un dentífrico, o se puede añadir en una cantidad terapéuticamente eficaz a una composición que puede incluir agua, agentes aglutinantes, agentes abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes y humectantes. Como alternativa, las composiciones se pueden  
45 producir en una forma de comprimido o solución que se puede colocar debajo de la lengua o de otra manera se puede disolver en la boca. Las formulaciones de vacuna también se pueden administrar a la mucosa nasal, se pueden proporcionar en aerosol para suministro mediante inhalación, o se pueden suministrar a las superficies mucosas de la zona genital femenina y masculina o del recto. Las formulaciones de vacuna también se pueden formular para administración transdérmica.

50 En determinadas circunstancias, será deseable suministrar las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento por vía parenteral, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía intratraqueal o incluso por vía intraperitoneal. Tales enfoques son bien conocidos por el experto en la materia, algunos de los cuales se describen adicionalmente, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.543.158; documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.641.515 y documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.399.363. Como tal, en una realización, las composiciones de la invención se pueden suministrar a través de inhalación, inyección intravenosa, inyección intracardiaca, por vía intratraqueal. En otra realización, las composiciones de la invención se administran mediante ventilación mecánica. En ciertas realizaciones, se pueden preparar soluciones de los compuestos activos en forma de base libre o sales farmacológicamente aceptables en agua mezcladas de forma  
55 adecuada con un agente tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones por lo general contendrán un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

65 Las formas farmacéuticas ilustrativas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles (por

ejemplo, véase el documento de patentes de Estados Unidos N.º 5.466.468). En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar previamente contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y/o aceites vegetales. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y/o mediante el uso de agentes tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede ser facilitada por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede ser provocada por el uso en las composiciones de agentes retardadores de la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En una realización, para administración parenteral en una solución acuosa, la solución se debería también a de forma adecuada, si fuera necesario y el diluyente líquido primero se hace isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas en particular son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. En este sentido, un medio acuoso estéril que se puede emplear será conocido por los expertos en la materia a la vista de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosificación se puede disolver en 1 ml de solución isotónica de NaCl y se puede añadir a 1000 ml del fluido de hipodermoclasia o se puede inyectar en el sitio de infusión propuesto (véase por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Alguna variación en la dosificación se producirá necesariamente dependiendo del estado del sujeto que se está tratando. Además, para administración humana, las preparaciones por supuesto y preferentemente cumplirán con los requisitos de esterilidad, pirogenicidad y los estándares generales de seguridad y pureza de acuerdo con lo requerido por los estándares de la Office of Biologics de la FDA.

Las composiciones desveladas en la presente invención se pueden formular en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables ilustrativas incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos fosfórico o clorhídrico o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden obtener a partir de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Después de la formulación, las soluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad de modo que sea terapéuticamente eficaz.

Los vehículos pueden comprender adicionalmente todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, vehículos, revestimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, tampones, soluciones vehículo, suspensiones, coloides y similares. El uso de los medios y agentes de este tipo para sustancias farmacéuticas activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, su uso se contempla en las composiciones terapéuticas. En las composiciones también se pueden incorporar principios activos suplementarios. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o inapropiada similar cuando se administran a un ser humano.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden suministrar mediante pulverización de agentes intranasales, inhalación, y/u otras administración mediante vehículos de aerosoles. Se han descrito métodos para administrar genes, ácidos nucleicos y composiciones de péptidos directamente a los pulmones a través de pulverizaciones de aerosol nasal, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.756.353 y en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.804.212. De forma análoga, la administración de polinucleótidos (por ejemplo, vectores víricos) usando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga *et al.*, J Controlled Release (1998) 52 (1-2): 81-7; y Moss, *et al.*, Human Gene Therapy, 18: 726-732 (agosto de 2007)) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.725.871) también son bien conocidos en las técnicas farmacéuticas. De forma análoga, en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.780.045 se describe la administración de fármaco transmucosal ilustrativa en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno.

En ciertas realizaciones, se usan liposomas, nanocápsulas, micropartículas, partículas lipídicas, vesículas, y similares, para la introducción de vectores/viriones de la presente invención en células/organismos hospedadores adecuados. En particular, los vectores/viriones de la presente invención se pueden formular para su administración ya sea encapsulados en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, o una nanopartícula o similar. Como alternativa, los vectores/viriones de la presente invención se pueden unir de forma covalente o no covalente a la superficie de tales vehículos de transporte.

La formación y uso de liposomas y preparaciones similares a liposomas como vehículos potenciales de fármaco potencial por lo general son conocidos por los expertos en la materia (véase por ejemplo Lasic, Trends Biotechnol (1998) 16 (7): 307-21; Takakura, Nippon Rinsho (1998) 56 (3): 691-5; Chandran *et al.*, Indian J Exp Biol (1997) 35

(8): 801-9; Margalit, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst (1995) 12 (2-3): 233-61; documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.567.434; documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.552.157; documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.565.213; documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.738.868 y documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.795.587.

Como alternativa, en el presente documento se desvelan formulaciones de nanocápsulas farmacéuticamente aceptables de las combinaciones desveladas en el presente documento. Por lo general, las nanocápsulas pueden atrapar compuestos de una manera estable y reproducible (véase, por ejemplo, Quintanar-Guerrero *et al.*, Drug Dev India Pharm (1998) 24 (12): 1113-28). Para evitar efectos secundarios debidos a la sobrecarga polimérica intracelular, tales partículas ultrafinas (con un tamaño de aproximadamente 0,1 µm) se pueden diseñar usando polímeros que se pueden degradar *in vivo*. Dichas partículas se pueden preparar como se describe, por ejemplo, en Couvreur *et al.*, Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988; 5 (1): 1-20; en Muhlen *et al.*, Eur J Pharm Biopharm (1998) 45 (2): 149-55; Zambaux *et al.*, J Controlled Release (1998) 50 (1-3): 31-40; y documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.145.684.

La presente invención contempla una diversidad de programas de dosificación que se describen en el presente documento, así como otros que no se describen en el presente documento, pero de otro modo podrían ser conocidos por un experto en la materia. La invención incluye programas de dosificación continua, en los que un vector o virión de la invención se administra de forma regular (diaria, semanal, mensual, dependiendo de la dosis y forma de dosificación) sin pausas sustanciales. Los programas de dosificación continua preferentes incluyen una administración continua diaria en la que un vector o virión de la invención se administra cada día, y programas de administración continua de bolo, en los que un vector o virión se administra al menos una vez al día mediante inyecciones intravenosas o subcutáneas. Los ejemplos de programas de administración continua incluyen, pero no se limitará, al menos 2, 3, 4, 5, 6, o 7 días, al menos 1, 2, 3, 4, 5 o 6 semanas o más, o cualquier combinación de los mismos.

La invención también incluye programas de dosificación discontinua. Los parámetros exactos de los esquemas de administración discontinua variarán de acuerdo con la formulación, método de administración y las necesidades clínicas del sujeto. Por ejemplo, si se administra el vector o virión de la invención mediante inhalación, no se administran programas de administración que comprenden un primer periodo de administración seguido de un segundo periodo en el que el vector o virión de la invención, que es mayor que, igual a, o menor que el periodo en el que se administra el vector o virión de la invención. Los ejemplos de programas de administración discontinua para administración por inhalación incluyen, pero no se limitan a, programas que comprenden periodos seleccionados entre 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más semanas, o cualquier combinación de los mismos, y periodos de descanso seleccionados entre 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más semanas.

Los programas de administración continua y discontinua mediante cualquier método también incluyen programas de dosificación en los que la dosis se modula a lo largo del periodo eficaz, de modo que, al principio del periodo de administración del vector o del virión de la invención; la dosis es baja y aumenta hasta el final del periodo de administración del vector o virión de la invención; la dosis es inicialmente alta y disminuye durante el periodo de administración del vector o virión de la invención; la dosis es inicialmente baja, aumenta hasta un nivel máximo, luego se reduce hacia el final del periodo de administración del vector o virión de la invención; y cualquier combinación de los mismos. Además, los programas de dosificación se pueden preparar usando cualquier método convencional en la técnica, tal como un sistema de catéter.

Las composiciones comprenderán material genético suficiente para producir una cantidad terapéuticamente eficaz de SERCA2 o porciones o fragmentos o fragmentos funcionales de interés, es decir, una cantidad suficiente para reducir o mejorar los síntomas del estado patológico en cuestión o una cantidad suficiente para conferir el beneficio deseado. Las composiciones también pueden contener un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales excipientes incluyen cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos dañinos para el individuo que recibe la composición, y que se puedan administrar sin toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sorbitol, cualquiera de los diversos compuestos TWEEN, y líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. En los mismos se pueden incluir sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. Además, en los vehículos de este tipo pueden estar presentes sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulgentes, sustancias tamponadoras de pH, y similares. Una discusión minuciosa de excipientes farmacéuticamente aceptables está disponible en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Una formulación particularmente útil incluye viriones de AAV recombinante en combinación con uno o más alcoholes dihidricos o polihidricos, y, opcionalmente, un agente, tal como éster de sorbitán. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N.º WO 00/32233.

Como es evidente para los expertos en la materia a la vista de las enseñanzas de la presente memoria descriptiva, una cantidad eficaz de vector vírico que se debe añadir se puede determinar de forma empírica. La administración

se puede realizar en una dosis, de forma continua o intermitente a lo largo del periodo de duración del tratamiento. Los métodos para determinar el medio y las dosis más eficaces de administración son bien conocidos por los expertos en la materia y variarán con el vector vírico, la composición de la terapia, las células diana y el sujeto que se está tratando. Se pueden realizar administraciones únicas y múltiples con el nivel y el patrón de dosis seleccionados por el médico tratante.

Se debería entender que más de un transgén se puede expresar por el virión recombinante suministrado. Como alternativa, también se pueden suministrar vectores separados, cada uno de los cuales expresa uno o más transgenes diferentes, como se describe en el presente documento. Además, también está previsto que los vectores víricos suministrados por los métodos de la presente invención se combinen con otras composiciones y terapias adecuadas. Cuando el transgén está fuera del control de un promotor inducible, ciertos compuestos administrados por vía sistémica tales como muristerona, ponasterona, tetraciclina o aulina se pueden administrar para regular la expresión del transgén.

Por consiguiente, las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden contener el transgén de SERCA2a unido de forma operativa a diversos elementos reguladores en un vector AAV, sustancialmente similares a los que se han descrito anteriormente, incluyendo cualquier excipiente o vehículo o agente necesario para efectuar una administración eficaz, pero no tóxica de las composiciones terapéuticas. También se producirán composiciones de AAV de control, por ejemplo construcciones de AAV-GFP.

Además, con el fin de distinguir entre SERCA2a suministrado con AAV y su homólogo endógeno, se puede construir un vector AAV que codifica una SERCA2a recombinante unido de forma operativa con una etiqueta de proteína fluorescente de color verde (GFP) (AAV-SERCA2a-GFP) para su reconocimiento.

La célula hospedadora (o célula de empaquetamiento) también debe ser capaz de proporcionar funciones no obtenidas a partir de VAA, o "funciones auxiliares", con el fin de producir viriones de rAAV. Las funciones auxiliares son funciones víricas y/o celulares no obtenidas a partir de VAA sobre las que depende el AAV para su replicación, incluyendo al menos las proteínas que no son AAV y los ARN que se necesitan en la replicación de AAV, incluyendo los implicados en la activación de la transcripción genética de AAV, corte y empalme de ARNm de AAV específico de la etapa, replicación de ADN de AAV, síntesis de productos de expresión de Cap y ensamblaje de la cápside de AAV. Las funciones auxiliares basadas en virus se pueden obtener a partir de cualquiera de los virus auxiliares conocidos.

En particular, se pueden introducir funciones auxiliares y a continuación expresarse en células hospedadoras usando métodos conocidos por los expertos en la materia. Por lo general, las funciones auxiliares se proporcionan mediante la infección de las células hospedadoras con un virus auxiliar no unido. Se conoce una serie de virus auxiliares adecuados, incluyendo adenovirus; virus del herpes, por ejemplo, los tipos 1 y 2 del virus del herpes simple; y virus vaccinia. Las funciones auxiliares no víricas también encontrarán uso en la presente invención, tales como las proporcionadas por la sincronización celular usando cualquiera de diversos agentes conocidos. Véase, por ejemplo, Buller *et al.*, (1981) *J. Virol.* 40: 241 247; McPherson *et al.*, (1985) *Virology* 147: 217 222; Schlehofer *et al.*, (1986) *Virology* 152: 110 117.

Como alternativa, se pueden proporcionar funciones auxiliares usando un vector de función auxiliar como se ha definido anteriormente. Véase, por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.004.797 y Publicación Internacional N.º WO 01/83797. Las secuencias de ácidos nucleicos que proporcionan las funciones auxiliares se pueden obtener a partir de fuentes naturales, tales como del genoma de una partícula de adenovirus, o construidas usando métodos recombinantes o sintéticos conocidos en la técnica. Además, el complemento completo de genes de adenovirus no es necesario para las funciones auxiliares accesorias. De hecho, se ha mostrado que los mutantes de adenovirus incapaces de replicación de ADN y síntesis tardía de genes se pueden permitir para la replicación de AAV. Ito *et al.*, (1970) *J. Gen. Virol.* 9: 243; Ishibashi *et al.*, (1971) *Virology* 45: 317; y Carter *et al.*, (1983) *Virology* 126: 505. Por ejemplo, los informes muestran que las regiones E1A y E4 son probablemente necesarias para la replicación de AAV, ya sea directa o indirectamente. Laughlin *et al.*, (1982) *J. Virol* 41: 868; Janik *et al.*, (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1925; Carter *et al.*, (1983) *Virology* 126: 505. Además, Publicación Internacional N.º WO 97/17458 y Matshushita *et al.*, (1998) *Gene Therapy* 5: 938 945, describen vectores de función auxiliar que codifican diversos genes adenovíricos.

La infección de la hospedadora con un virus auxiliar, o transfección de la célula hospedadora con un vector de función auxiliar, permite la expresión de las funciones auxiliares que transactivan la construcción auxiliar de AAV para producir proteínas Rep y/o Cap de AAV. Los productos de expresión de Rep, a su vez escinden el ADN recombinante (incluyendo el ADN de interés, por ejemplo, SERCA2) del vector de expresión de AAV. Las proteínas Rep también sirven para duplicar el genoma del AAV. Las proteínas Cap expresadas se ensamblan en cápsides y el genoma del AAV recombinante se empaqueta en las cápsides, la replicación de AAV avanza y el ADN se empaqueta en viriones de rAAV.

Después de la replicación de AAV recombinante, los viriones de rAAV se pueden purificar a partir de la célula hospedadora usando una diversidad de métodos de purificación convencionales, tales como cromatografía en

columna, gradientes de CsCl, y similares. Por ejemplo, se puede usar una pluralidad de etapas de purificación en columna, tales como purificación sobre una columna de intercambio aniónico, una columna de afinidad y/o una columna de intercambio catiónico. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N.º WO 02/12455. Además, si la infección se emplea para expresar las funciones auxiliares, el virus auxiliar residual sector inactivar usando métodos conocidos. Por ejemplo, el adenovirus se puede inactivar calentando a temperaturas de aproximadamente 60 °C durante, por ejemplo, 20 minutos o más. Este tratamiento inactiva de forma eficaz solamente al virus auxiliar ya que el AAV es extremadamente estable al calor mientras que el adenovirus auxiliar es termolábil.

Los viriones de rAAV resultantes que contienen la secuencia de nucleótidos de SERCA2a de interés, o fragmento, o fragmento funcional, o porción del mismo se pueden usar a continuación para administración genética usando las técnicas que se describen a continuación.

Los viriones de rAAV recombinantes se puede introducir en células de músculo liso usando cualquier técnica de transducción *in vivo* o *in vitro* (también denominado *ex vivo*). Si se transduce *in vitro*, la célula receptora deseada, preferentemente una célula muscular, se retirará del sujeto, se transducirá con viriones de rAAV y se volverá a introducir en el sujeto. Como alternativa, se pueden usar células singeneicas o xenogeneicas en las que esas células no generarán una respuesta inmunológica inapropiada en el sujeto.

Se han descrito métodos adecuados para la administración e introducción de células transducidas en un sujeto. Por ejemplo, las células se pueden transducir *in vitro* combinando viriones de AAV recombinante (rAAV) con células a transducir en medios apropiados, y aquellas células que albergan el ADN de interés se pueden identificar sistemáticamente utilizando técnicas convencionales tales como transferencias de Southern y/o PCR, o usando marcadores seleccionables. A continuación, las células transducidas se pueden formular en composiciones farmacéuticas, como se ha descrito anteriormente, y la composición se puede introducir en el sujeto mediante diversas técnicas tal como se describe a continuación, en una o más dosis.

Los viriones de AAV recombinante (rAAV) o células transducidas *in vitro* se pueden administrar directamente al músculo por inyección con una aguja, catéter o dispositivo relacionado, usando técnicas conocidas en la materia. Para la administración *in vivo*, los viriones de rAAV se formularán en composiciones farmacéuticas y una o más dosificaciones se pueden administrar directamente de la manera indicada. Una dosis terapéuticamente eficaz se incluirá del orden de aproximadamente  $10^8$ /kg a  $10^{16}$ /kg de los viriones de rAAV, más preferentemente de  $10^{10}$ /kg a  $10^{14}$ /kg, e incluso más preferentemente de aproximadamente  $10^{11}$ /kg a  $10^{13}$ /kg de los viriones de rAAV (o genomas víricos, también denominados "vg" o "v.g."), o cualquier valor dentro de estos intervalos.

Un modo de administración de viriones de AAV recombinante usa un sistema de administración potenciado por convección (CED). De esta manera, los viriones recombinantes se pueden administrar a muchas células sobre grandes áreas de músculo. Además, los vectores suministrados expresan de forma eficaz transgenes en células musculares. Cualquier dispositivo de administración potenciado por convección puede ser apropiado para la administración de vectores víricos. En una realización preferente, el dispositivo es una bomba osmótica o una bomba de infusión. Tanto las bombas osmóticas como las de infusión están disponibles en el mercado en una diversidad de proveedores, por ejemplo Alzet Corporation, Hamilton Corporation, Alza, Inc., Palo Alto, Calif.). Por lo general, un vector vírico se administra a través de dispositivos CED como sigue a continuación. Un catéter, cánula u otro dispositivo de inyección se inserta en el tejido muscular apropiado en el sujeto elegido, tal como músculo esquelético. Para una descripción detallada con respecto a la administración con CED, véase el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.309.634.

Aunque en el presente documento se describe un método de perfusión, se dispone de diversos métodos de perfusión y son convencionales en la técnica, y sin quedar relacionado con un método cualquiera, se prevé cualquier método de perfusión que de el resultado deseado, tal como un método que utiliza un catéter. El objetivo de los métodos de perfusión es aumentar el tiempo de contacto entre el vector (*por ejemplo*, vectores de adenovirus, AAV, lentivirus) y las células diana (*por ejemplo*, células de músculo liso). Por lo tanto, la invención incluye métodos de perfusión tales como métodos de perfusión en circuito cerrado realizados a temperatura corporal, y en condiciones definidas, por ejemplo, 37 °C, durante aproximadamente 2, 5, 10, 12, 15, 30, 60 o más minutos, en animales superiores o seres humanos durante aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12 o más horas, permitiendo la entrada vírica en las células diana y crear condiciones óptimas para expresión genética y síntesis de proteínas. Por esta razón, se pueden añadir diversos excipientes, aminoácidos naturales y no naturales, factores de crecimiento y similares para proporcionar material suficiente para la síntesis de proteínas.

Para determinar la eficacia en los modelos animales que recibieron las composiciones de AAV-SERCA2 o AAV-SERCA2a, el efecto sobre la presión de la arteria pulmonar y la función cardíaca se puede determinar usando un sistema de medición del volumen de presión después de la inyección, por ejemplo, una semana o un mes después de la inyección. Las mediciones repetidas se pueden continuar con el fin de supervisar los efectos a corto y largo plazo y la eficacia de la terapia. Por ejemplo, si después de una semana se considera que los resultados no son significativos, entonces se pueden realizar nuevos ensayos usando dosificaciones más altas (o más bajas), o dosificaciones múltiples.

Se pueden realizar estudios para determinar la expresión genética que incluyen la eliminación de tejidos pulmonares que reciben la perfusión, así como los tejidos circundantes y/o de control. Los tejidos se pueden procesar por vía histológica con métodos convencionales en la técnica, por ejemplo, métodos de fijación, métodos de vibratomo o corte, etc. Por ejemplo, para estudiar la expresión genética de SERCA2 o SERCA2a u otras isoformas de SERCA2, se puede realizar inmunohistoquímica usando un SERCA2 o polinucleótidos o anticuerpos de SERCA2a que son inmunogénicos contra SERCA2 o polipéptidos de SERCA2. Además, para aquellos animales que reciben las composiciones de AAV-GFP, la expresión de GFP en los tejidos se puede medir usando microscopía de fluorescencia o cualquier otro método convencional en la materia que pueda medir y detectar fluorescencia.

La presente invención se describe más particularmente en los siguientes ejemplos que se pretende que sean solamente ilustrativos ya que numerosas modificaciones y variaciones en los mismos eran evidentes para los expertos en la materia. Se pretende que los siguientes ejemplos ilustren pero que no limiten la invención.

#### EJEMPLO 1

La transferencia genética (introducción de genes exógenos usando vector vírico o no vírico) usando virus adeno-asociado (AAV: tipo de virus) se conoce bien por su seguridad y capacidad para expresar genes exógenos durante un largo periodo de tiempo. La sobreexpresión de SERCA2a usando adenovirus mostró que gritaba la remodelación de células del músculo liso en la arteria coronaria y aumentada la relajación y producción de eNOS, que es un vasodilatador bien conocido. (Hadri L, Circ Res 2007; 101: E65-E65). Como tal, se plantea la hipótesis de que la sobreexpresión de SERCA2a en la arteria pulmonar usando un virus adeno-asociado previene la remodelación de células de músculo liso en la arteria pulmonar y la producción de eNOS para disminuir la vasoconstricción.

El experimento se realiza sobre el control y la hipertensión pulmonar, así como la hipertensión pulmonar con terapia genética o inyección de virus de control, mide la contractilidad cardíaca y hemodinámica, incluyendo la resistencia arterial pulmonar y la resistencia arterial sistémica. La PAH inducida por monocrotalina (MCT) es un modelo de PAH clínicamente relevante y fácil de realizar en ratas.

La hipertensión pulmonar se indujo en las ratas Sprague-Dawley macho (intervalo de peso de 250-300 g) mediante inyección subcutánea de monocrotalina (MCT), que se disolverá en HCl 0,1 N y se neutralizará con NaOH 1 N (pH = 7,4) y se administrará a una dosis de 50 mg/kg. Al mismo tiempo, AAV1.SERCA2a se administró a través de un catéter dentro del tubo traqueal en el pulmón mientras que el animal respiraba de forma espontánea. El efecto en la presión arterial pulmonar y la función cardíaca se determinó un mes después con un sistema de medición de presión-volumen. El tampón HN se usará para el control de MCT, y la solución salina se usará para el control de AAV.

El control (n = 8) y los grupos de tratamiento (n = 8) eran comparables en su peso corporal en la medida inicial. La transfección eficaz se confirmó con inmunohistoquímica. El cateterismo de la arteria pulmonar y del ventrículo derecho mostraba una presión significativamente mayor en los animales tratados ( $4,9 \pm 0,5$  kPa con respecto a  $6,1 \pm 0,6$  kPa,  $P < 0,05$ ) (véanse las Figuras 1A-1D) así como las presiones diastólicas ventriculares ( $0,4 \pm 0,1$  kPa con respecto a  $0,6 \pm 0,2$  kPa,  $P < 0,05$ ). Las presiones del ventrículo izquierdo permanecieron sin cambios (sistólica:  $12,6 \pm 0,8$  kPa con respecto a  $13,5 \pm 0,7$  kPa) así como  $dP/dt_{Máx}$  ( $769,9 \pm 78,6$  kPa con respecto a  $853,8 \pm 109,2$  kPa/s). El peso del ventrículo derecho en el momento del sacrificio al mes se redujo de forma significativa en el grupo de SERCA2a ( $0,32 \pm 0,02$  con respecto a  $0,39 \pm 0,03$  g,  $P < 0,05$ ). El peso del ventrículo izquierdo ajustado al peso corporal no difería entre los grupos.

#### EJEMPLO 2

Los estudios con animales fueron aprobados por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de Animales (IACUC). Todos los procedimientos relacionados con animales se realizaron de acuerdo con las Directrices del IACUC. Las ratas Sprague-Dawley macho (intervalo de peso de 250-300 g) o ratas Wistar (intervalo de peso de 90-150 g) se dividirán en grupos de Inyección o Perfusión por el método de transfección y se subdividirán en 4 subgrupos: Control + Solución Salina (Grupo de control, n = 4), Control + AAV1. GFP (grupo GFP, n = 4), PH + AAV1.SERCA2a inducido por MCT (grupo de SERCA2a, n = 6) y PH + Solución Salina inducido por MCT (Grupo de Solución Salina, n = 6).

Se realizará un estudio adicional en el que los animales se dividen como sigue a continuación:

(A) Grupo de PAH con MCT con Inyección intratraqueal

Grupo de AAV.SERCA2a (n = 40)  
 Grupo de AAV.eNOS (n = 40)  
 Grupo de AAV. GFP o beta-gal (n = 40)

## (B) Grupo de PAH con MCT con inyección en la vena yugular

- 5 Grupo de AAV.SERCA2a (n = 40)  
 Grupo de AAV.eNOS (n = 40)  
 Grupo de AAV.GFP o beta-gal (n = 40)

10 *Administración Intra-Traqueal de AAV* - El procedimiento se realiza en ratas Wistar macho (BW = 100 g) o Ratas Sprague-Dawley (BW = 250-300 g). Las ratas reciben anestesia general (isoflurano al 0,5-1,5 % en oxígeno al 100 % a través de máscara). Después de la intubación endotraqueal, se inicia la ventilación mecánica. Después de estabilizar el estado general, se colocará un pequeño catéter de elastómero de silicona a través del tubo de intubación y se usará para administrar AAV en los pulmones.

15 *Administración de AAV en la Vena Yugular* - Como se ha mencionado anteriormente, el procedimiento se realiza en ratas Wistar macho de 100 gramos. Sin embargo, en lugar de usar administración intra-traqueal, el AAV se administrará mediante inyección en la vena yugular. El cuello se preparará con alcohol isopropílico al 70 % seguido de providona yodada. Se realizará un corte para exponer la vena yugular y la vena yugular se pinchará con la aguja de calibre 26 G. El AAV (400 µl) se inyectará lentamente en la vena yugular.

20 *Inducción de PAH* - Los animales recibirán MCT (40 mg/kg) a través de inyección subcutánea el Día 28.

25 *Ecocardiografía* - Los animales recibirán sedación con 80-100 mg/kg de ketamina IP ya que no hay dolor en este procedimiento, la sedación solamente se necesita para evitar el artefacto de movimiento y otros agentes anestésicos pueden interferir de forma significativa con el ritmo cardiaco o la contractilidad y la carga cardiaca. La función cardiaca se evaluará mediante ecocardiografía. Desde la pared torácica anterior izquierda, se aplicará una sonda de eco. Se evaluarán la dilatación de las cámaras cardiacas y la disminución de la contractilidad cardiaca.

30 Entre las semanas 4 y 12 los animales se supervisarán dos veces a la semana y se evaluarán para detectar signos de insuficiencia cardiaca severa y disnea, tales como 1) actividad alterada, 2) renuencia a moverse, 3) agitación, 4) disminución de la ingesta oral, 5) espuma en la boca, 6) sibilancias audibles, 7) ascitis masiva. Si presentan alguno de los signos clínicos mencionados anteriormente, se sacrificarán. La expresión máxima de una proteína exógena se consigue de 6 a 8 semanas después de la administración de AAV. El MCT-PAH se desarrolla completamente de 3 a 4 semanas después de la inyección de MCT. Como tal, son necesarios al menos 28 días para obtener la expresión máxima de proteína exógena en el momento en el que la rata inyectada con MCT comienza a presentar síntomas. Además, los inventores tienen que esperar de 28 a 56 días después de la inyección de MCT para obtener PAH clínicamente significativa.

35 *Medición hemodinámica usando catéteres Scisense de presión-volumen* - La anestesia se induce en una cámara de isoflurano y, después de la inducción, los animales se ventilan con una mezcla de oxígeno e isoflurano al 2-5 % a través de un cono en la nariz. Después de obtener una anestesia profunda estable, los animales se intuban y se administra isoflurano al 2-5 % a través de ventilación mecánica, junto con oxígeno. Se abrirá la caja torácica. En el ventrículo izquierdo y derecho se introducirá un catéter Scisense de presión-volumen o un catéter Millar. La medición de la aurícula derecha media, arteria pulmonar, aurícula izquierda y aorta se realizará con este catéter. El gasto cardiaco se medirá al mismo tiempo usando este catéter. Durante las mediciones hemodinámicas, el isoflurano se valorará tanto para mantener la anestesia general como para conseguir una frecuencia cardiaca lo más cercana posible a las frecuencias cardiacas fisiológicas. A menudo, esto es posible solamente con un 1 % de isoflurano. Al final del procedimiento se pone una cánula en la vena yugular izquierda o derecha y se inyectan 50 microlitros de cloruro sódico al 30 % para calibrar los sensores de volumen. Los animales se sacrifican al final del procedimiento; siendo el corazón y los pulmones extirpados quirúrgicamente con anestesia general profunda con isoflurano al 5 %.

40  $PVR \text{ (dinas} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}) = (mPAP - mLA) / CO * 80$ ;  $SVR \text{ (dinas} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}) = (mSAP - mRA) / CO * 80$ .

45 La supervisión del peso corporal después de la terapia genética (si fuera aplicable) y la administración de MCT se produce durante todo el experimento. El peso corporal se mide y se registra antes de cada cirugía, terapia genética y antes de cada ecocardiografía para supervisar el crecimiento y el bienestar de los animales y para tener un índice del tamaño cardiaco

50 Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a detalles específicos de ciertas realizaciones de los mismos, se entenderá que las modificaciones y variaciones están incluidas dentro del alcance de la invención. Por consiguiente, la invención está limitada únicamente por las reivindicaciones que siguen a continuación.

60

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un vector de expresión vírico adeno-asociado (AAV) para su uso en el tratamiento de hipertensión pulmonar, que comprende un transgén de calcio<sup>++</sup> ATPasa del retículo sarcoplasmático (SR) (SERCA), en el que el transgén es la isoforma 2a de SERCA (SERCA2a) y modula al transporte de iones Ca<sup>2+</sup>, y en el que la expresión del transgén aumenta la función de la célula hospedadora en un sujeto.
- 10 2. El vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células hospedadoras están asociadas a la función pulmonar.
- 15 3. El vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que las células hospedadoras se seleccionan entre el grupo que consiste en células musculares de la arteria pulmonar, células musculares de la vena pulmonar, células musculares de capilar pulmonar, arteriolas pulmonares, alvéolos, y células de músculo liso vascular.
- 20 4. El vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, en el que el vector es de serotipo 1 (AAV1), serotipo 2 (AAV2) o serotipo 8 (AAV8).
- 25 5. El vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tratamiento disminuye la presión sanguínea en la arteria pulmonar o la vena pulmonar, da como resultado una disminución de la presión sistólica y la presión diastólica ventricular, mejora la remodelación vascular pulmonar, disminuye la proliferación de células del músculo liso vascular, o aumenta la producción de eNOS a partir de células endoteliales.
- 30 6. El vector para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el sujeto es un mamífero.
- 35 7. El vector para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el mamífero es un ser humano.
- 40 8. El vector para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 6, en el que el vector se administra mediante un método seleccionado entre el grupo que consiste en pulverización intranasal, inhalación y administración por aerosol.
- 45 9. El vector para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, 6 y 7, en el que el vector se administra en forma de una micropartícula.
- 50 10. Un virión de virus adeno-asociado (AAV) recombinante para su uso en el tratamiento de hipertensión pulmonar, en el que (a) el virión comprende un vector AAV que comprende un transgén unido de forma operativa a elementos de control que dirigen la expresión del transgén en una célula hospedadora, (b) la expresión del transgén mejora la función pulmonar, y (c) el transgén es la isoforma 2a (SERCA2a) de calcio<sup>++</sup> ATPasa (SERCA) del retículo sarcoplasmático (SR).
- 55 11. Un virión de AAV recombinante (rAAV) para su uso en el tratamiento de hipertensión pulmonar, rAAV que comprende un polinucleótido que codifica una proteína, en el que (a) el polinucleótido está unido de forma operativa a un elemento de control capaz de dirigir la expresión de la proteína, (b) el virión rAAV se administra directamente en una célula muscular pulmonar de un sujeto mamífero, (c) la proteína es la isoforma 2a (SERCA2a) de calcio<sup>++</sup> ATPasa del retículo sarcoplasmático (SR) y (d) la proteína se expresa a un nivel terapéuticamente eficaz en la célula muscular.
- 60 12. El virión de AAV recombinante para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el sujeto es un ser humano.
- 65 13. El virión de AAV recombinante para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que el virión se administra mediante un método seleccionado entre el grupo que consiste en pulverización intranasal, inhalación y administración por aerosol.
- 70 14. El virión de AAV recombinante para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que el virión se administra en forma de una micropartícula.

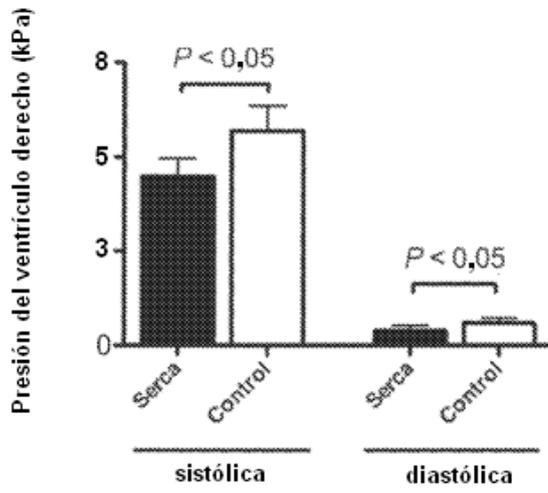


Fig. 1A

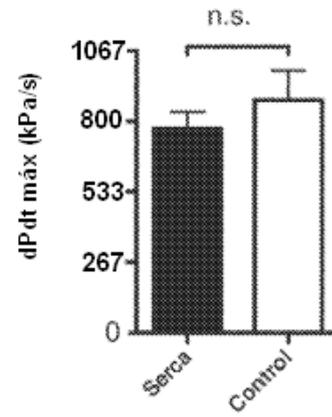


Fig. 1B

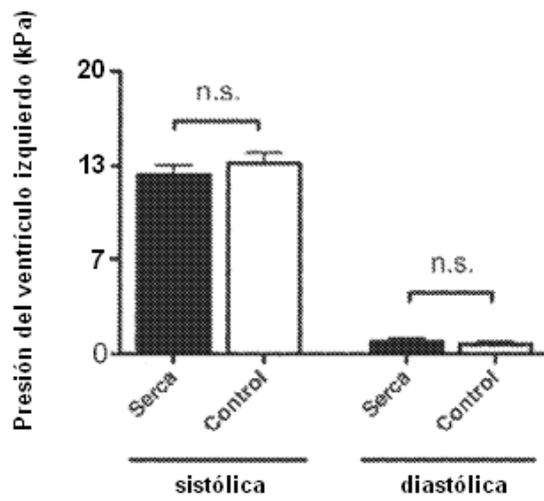


Fig. 1C

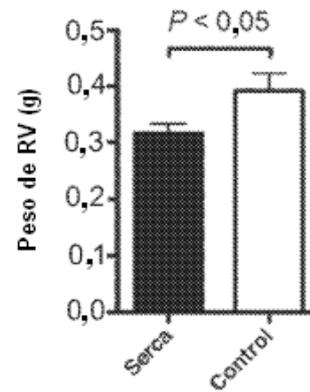


Fig. 1D